

STATISTISCHE ANALYSE VON EINZELKANAL - FLUKTUATIONEN
AM BEISPIEL DES CALCIUM - ABHÄNGIGEN KALIUM - KANALS
VON KULTIVIERTEN EMBRYONALEN SKELETTMUSKELZELLEN
DER RATTE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr - Universität Bochum

vorgelegt von

Christoph Methfessel

aus

Witten

1983

STATISTISCHE ANALYSE VON EINZELKANAL - FLUKTUATIONEN
AM BEISPIEL DES CALCIUM - ABHÄNGIGEN KALIUM - KANALS
VON KULTIVIERTEN EMBRYONALEN SKELETTMUSKELZELLEN
DER RATTE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr - Universität Bochum

vorgelegt von

Christoph Methfessel

aus

Witten

1983

Referent: Prof. Dr. G. Boheim
Korreferent: Prof. Dr. A. Redhardt
Tag der mündlichen Prüfung:
8. Dezember 1983

1.	Einleitung	1
1.1	Die Zellmembran	1
1.2.	Einzelkanäle	8
1.3.	Thema dieser Arbeit	12
2.	Theorie der Einzelkanalfluktuationen	15
2.1.	Grundlagen	15
2.1.1.	Mathematische Beschreibung des Ionenkanals	15
2.1.2.	Einzelkanäle im chemischen Gleichgewicht	17
2.1.3.	Die Matrix Q	18
2.2.	Theorie der Markov-Prozesse	19
2.2.1.	Kontinuierliche Markov-Prozesse	20
2.2.2.	Vereinfachte Reaktionsschemata	22
2.2.3.	Diskrete Markov-Ketten	24
2.2.4.	Zusammenhang zwischen diskreter Kette und kontinuierlichem Prozeß	27
2.3.	Anwendungen	28
2.3.1.	Charakterisierung der Kanalkinetik	28
2.3.2.	Simulation von Einzelkanalfluktuationen	30
2.3.3.	Statistische Analyse von Einzelkanalfluktuationen	31
2.3.3.1.	Problematik der Einzelkanalanalyse	31
2.3.3.2.	Das Matrix-Auswertverfahren	32
2.3.3.3.	Beispiel	35
2.3.3.4.	Eingeschränktes Auswertverfahren	38
2.4.	Reaktionskinetik und Kanalmodelle	39
2.4.1.	Einfacher Kanal	39
2.4.2.	Spannungsabhängiger Kanal	41
2.4.3.	Agonisten-abhängiger Kanal	43
2.4.4.	Blockade-Reaktion	44
2.4.5.	Calcium-sensitives Gatter	45
2.4.6.	Kinetik der Bursts	46
2.4.7.	Aktivierungs-Blockade-Modell	47

3.	Experimentelle Methoden	49
3.1.	Die Patch-Clamp-Methode	49
3.1.1.	Prinzip	49
3.1.2.	Der Patch-Clamp Meßplatz	50
3.1.2.1.	Mikroskop	50
3.1.2.2.	Mechanischer Aufbau	51
3.1.2.3.	Elektrischer Aufbau	52
3.1.3.	Vorzeichenkonvention	55
3.1.4.	Verbesserter Lösungsaustausch: die 'flying patch' - Methode	55
3.1.5.	Die Patch-Pipetten	57
3.1.5.1.	Pipettenherstellung	57
3.1.5.2.	Microforge	58
3.1.5.3.	Poliervorgang	60
3.2.	Zellkultur von Myotubes	61
3.3.	Bestimmung der Calciumkonzentration	63
3.3.1.	Problematik der Calciumbestimmung	63
3.3.2.	Das Calcium-EGTA-Puffersystem	64
3.3.3.	Ca ⁺⁺ -gepufferte Meßlösungen	65
3.3.4.	Abschätzung der Calcium-Hintergrundkonzentration	66
3.4.	Statistische Auswertung	66
3.4.1.	Methode	66
3.4.2.	Datenerfassung	67
3.4.3.	Statistische Analyse	68
4.	Ergebnisse	70
4.1.	Versuchsdurchführung	70
4.2.	Qualitative Beschreibung der Einzelkanal-Fluktuationen	71
4.3.	Leitwert und Ionenselektivität	74
4.4.	TEA-Blockade des Kanals	76
4.5.	Blockade durch Co ⁺⁺ und andere Metallionen	78
4.6.	Spannungs- und Calcium-Abhängigkeit der Einzelkanalkinetik	80
4.6.1.	Qualitativ	81
4.6.2.	Gleichgewichtskonstante	84
4.6.3.	Zustandslebensdauern	86

5.	Diskussion	88
5.1.	Kinetik des Kanals	88
5.2.	Leitwert und Ionenselektivität	95
5.3.	Zur biologischen Funktion des Kanals	99
	Zusammenfassung	102
	Literatur	105

1. Einleitung

Schon der griechische Physiologe Galen (130 - 200) vermutete, daß die Muskelbewegungen höherer Tiere durch die Nerven ausgelöst werden. Er nahm an, daß die Nerven zu diesem Zweck ein 'subtiles fluidum' transportieren. Galvani (1737 - 1798) zeigte, daß das Zucken von Froschmuskeln durch eine elektrische Reizung des Nervs ausgelöst werden kann und somit elektrische Vorgänge bei der Erregung eine Rolle spielen. Der Weg zu einem gründlicheren Verständnis wurde durch die Zelltheorie von Schleiden und Schwann (ca. 1839) geebnet. Alle höheren Lebewesen bestehen aus diskreten, lebenden Einheiten, den Zellen. Bei großer Vielfalt der Erscheinungsformen und Funktionen ist der Grundaufbau aller Zellen bemerkenswert einheitlich. Dazu gehört, daß die Zelle durch eine Zellmembran nach außen begrenzt und vom umgebenden Medium abgetrennt wird.

1.1 Die Zellmembran

Die Zellmembran ist für kleinere, neutrale Moleküle wie Wasser, Sauerstoff und Kohlendioxid recht durchlässig. Für größere Moleküle (etwa ab $M_r = 100$) und vor allem für geladene Ionen bildet die Membran jedoch eine Barriere. Dies erlaubt der Zelle, den Ein- und Ausstrom solcher Substanzen streng zu regeln und beträchtliche Konzentrationsunterschiede zwischen Cytoplasma und Außenmedium aufrecht zu erhalten. So ist die Ionenzusammensetzung im Zellinneren bei allen lebenden Zellen völlig von der im Außenmedium verschieden. Für höhere Säugetiere sind die in Tab. 1 angegebenen Werte typisch. Bemerkenswert ist, daß die Konzentration an freien Calciumionen im Zellinneren unter normalen Bedingungen sehr niedrig ist.

Ist die Membran semipermeabel, also für die Ionen teilweise durchlässig, dann führt das Vorhandensein eines Ionengradienten zu einer elektrischen Potentialdifferenz (Katz 1966). So diffundieren zum Beispiel Kaliumionen entsprechend ihrem Konzentrationsgefälle aus einer Muskelzelle nach außen, wobei sich das Zellinnere negativ auflädt. Der elektrische Gradient hemmt dann einen weiteren Kalium - Ausstrom. Es existiert eine Spannung, bei welcher die elektrischen und chemischen Kräfte im Gleichgewicht stehen, so daß kein Netto - Ionenstrom auftritt. Dies ist das Nernst - Potential, gegeben durch

$$(1) \quad E = \frac{RT}{F} \ln \frac{C_a}{C_i}$$

Dabei ist R die Gaskonstante, F die Faraday - Konstante, T die absolute Temperatur, und C_a und C_i sind die Ionenkonzentrationen auf der Außen- und Innenseite der Membran.

Tabelle 1. Typische Ionenzusammensetzung im Inneren und Äußeren einer Säugetierzelle (aus Alberts et al. 1983).

Ion	innen, mM	außen, mM
Na^+	5 - 15	145
K^+	140	5
Mg^{++}	30	1 - 2
Ca^{++}	10^{-4}	2 - 5
Cl^-	4	110

Ist die Membran für mehrere Ionensorten unterschiedlich permeabel, so stellt sich ebenfalls ein Gleichgewichtspotential ein, welches (unter der Annahme einer konstanten Feldstärke in der Membran) durch die Goldman - Gleichung

$$(2) \quad V_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{p_K [\text{K}^+]_a + p_{\text{Na}} [\text{Na}^+]_a + p_{\text{Cl}} [\text{Cl}^-]_i + \dots}{p_K [\text{K}^+]_i + p_{\text{Na}} [\text{Na}^+]_i + p_{\text{Cl}} [\text{Cl}^-]_a + \dots} \right)$$

gegeben ist. Die p_x sind hier die Permeabilitäten für die verschiedenen Ionensorten, und die Konzentrationen werden, wie üblich, mit eckigen Klammern bezeichnet. Die Membran einer lebenden Zelle ist im Ruhezustand für Kalium wesentlich durchlässiger als für Natrium. Deshalb sind die Membran - Ruhepotentiale stets negativ und liegen zwischen -30 und -80 mV.

Beim Gleichgewichtspotential findet kein Netto - Ladungstransport über die Membran statt, weil sich die verschiedenen Ionenströme kompensieren. Es besteht jedoch ein Netto - Ionenstrom für jede einzelne Ionensorte, der z.B. für Na^+ durch

$$(3) \quad i_{\text{Na}} = g_{\text{Na}} \cdot (E_{\text{Na}} - V_m)$$

gegeben ist. i_{Na} ist der Natriumstrom, E_{Na} das Nernst - Potential für Natrium und g_{Na} ist die Natrium - Leitfähigkeit der Membran. Die Ionengradienten über der Membran einer lebenden Zelle werden also ständig dissipiert und müssen deshalb von der Zelle unter Aufwendung von Stoffwechselenergie aufrecht erhalten werden. Hierzu besitzt die Zelle Pumpen, wie zum Beispiel die $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, welche Ionen gegen ihr Konzentrationsgefälle transportieren. Die im Ionengradienten gespeicherte Energie wird von der Zelle auf manche Weise genutzt, zum Beispiel beim Transport von Metaboliten und Nährstoffen.

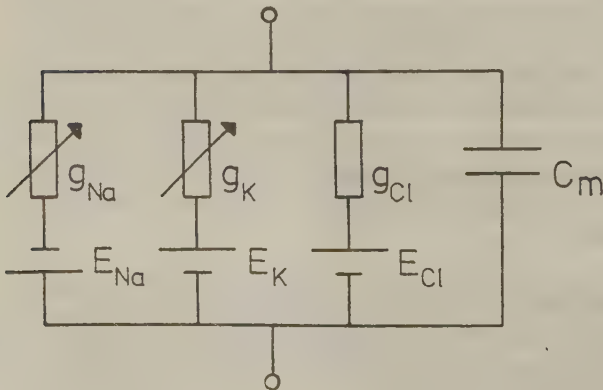
Schon Bernstein (1902) erkannte, daß der Kalium - Ionengradient und das damit verbundene Ruhepotential der Zellmembran die Möglichkeit geben, elektrische Signale zu erzeugen. Wenn die Membran lokal "undicht" wird und ihre Selektivität verliert, bricht das Membranpotential zusammen und es kommt zu stärkeren Ionenströmen. Diese Vorstellung wurde von Hogkin und Huxley (1952) korrigiert, weiterentwickelt und in der Ionentheorie der Erregung zu einem Abschluß gebracht. In ihren Arbeiten am Tintenfischaxon konnten sie zeigen, daß nicht eine unspezifische Leitfähigkeitserhöhung, sondern eine gezielte Folge von Permeabilitätsänderungen zur Ausbreitung von Aktionspotentialen führt. Nachdem ein schneller, transienter Anstieg der Natrium - Leitfähigkeit das Membranpotential umkehrt und bis auf + 40 mV ansteigen läßt, wird die Membran durch eine längerfristige Erhöhung der Kalium - Leitfähigkeit wieder repolarisiert. Hogkin und Huxley beschrieben diese Vorgänge mit einem System von gekoppelten Differentialgleichungen, welches nach Anpassung von nur wenigen experimentellen Parametern die Auslösung und den Verlauf der Aktionspotentiale mit erstaunlicher Präzision wiedergibt. Das dazu gehörige Ersatzschaltbild der Membran ist in Fig. 1 wiedergegeben.

Die Permeabilitätsänderungen während eines Aktionspotentials erfolgen innerhalb von wenigen Millisekunden, so daß ihre direkte Untersuchung schwierig ist. Mit der Voltage - Clamp - Methode (Hodgkin, Huxley und Katz 1952) wurde es möglich, die Spannungs- und Zeitabhängigkeit der

Permeabilitätsänderungen gezielt zu erforschen. In einer großen Zahl detaillierter Untersuchungen wurde eine Reihe von offenbar unabhängigen Ionenströmen entdeckt, die sich in ihrer Ionenselektivität, Kinetik und Empfindlichkeit gegen verschiedene Pharmaka voneinander unterscheiden. Dies ist der wesentliche Erfolg der klassischen Elektrophysiologie. Im Zusammenhang dieser Arbeit ist dabei besonders interessant, daß an Skelettmuskelzellen ein Kalium - Ausstrom gefunden wurde, der durch eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration ausgelöst wird (Fink et al. 1983).

Bei allen Erfolgen der Ionentheorie blieb lange Zeit völlig unklar, welche molekularen Vorgänge für die Permeabilitätsänderungen der Zellmembran verantwortlich sind. Dies ist sicher teilweise dadurch bedingt, daß die Struktur der Zellmembran überhaupt erst recht spät verstanden wurde. Zwar schlugen schon Gorter und Grendel (1925) aufgrund ihrer Versuche mit Erythrocyten richtig vor, daß eine Lipid - Doppelschicht das Grundgerüst der Membran bildet (Fig. 2a). Allerdings bestehen Zellmembranen nur zum Teil aus Lipid, wobei der Rest hauptsächlich Protein ist. Deshalb schlugen Davson und Danielli (1935) eine Sandwich - Struktur vor, bei welcher an eine isolierende, bimolekulare Lipidschicht zwei Proteinschichten angelagert sind (Fig. 2b). Nach der Entwicklung der Elektronenmikroskopie schien diese Vorstellung durch die ubiquitären 'railroad - track' - Streifen der 'unit membranes' im wesentlichen bestätigt (Robertson 1960).

Fig. 1. Ersatzschaltbild der Zellmembran in der Ionentheorie der Erregung (nach Katz 1966)



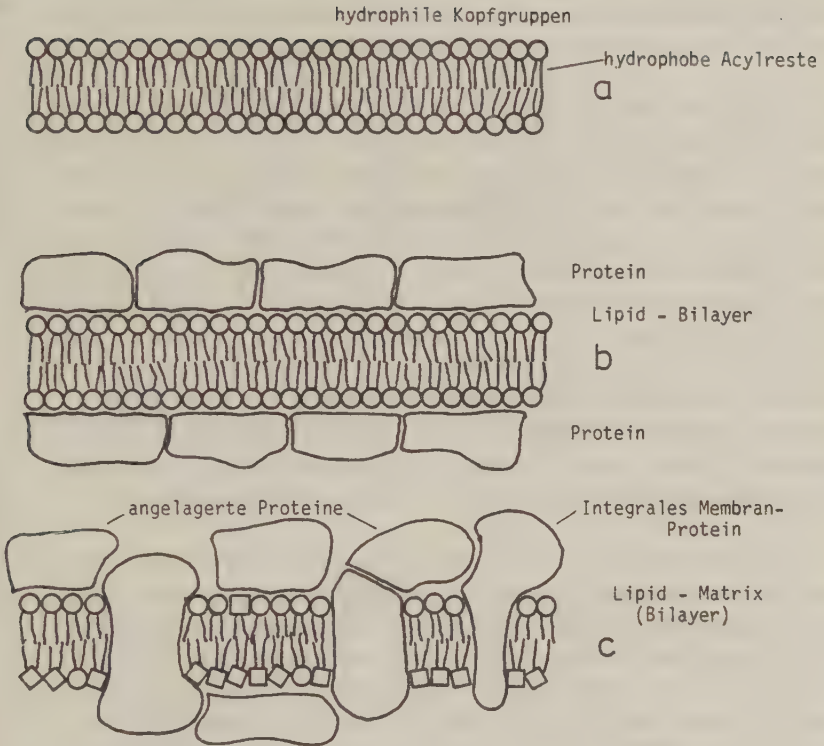


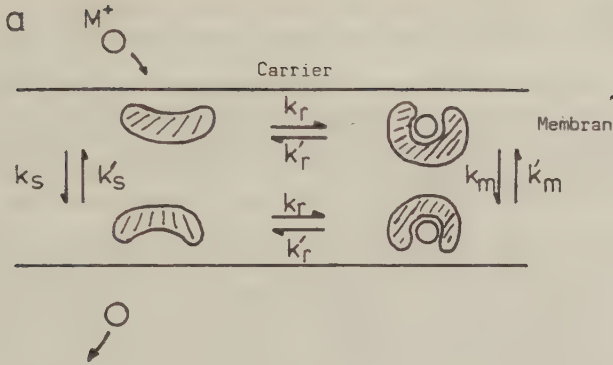
Fig. 2. Membranmodelle. a) Lipid - Bilayer b) Lipid - Protein Sandwichstruktur c) Asymmetrische Fluid - Mosaic - Membran.

In den darauffolgenden Jahren führte eine rasante Entwicklung auf vielen Gebieten zu wesentlich präziseren Vorstellungen über die Ultrastruktur der Membranen, die im 'fluid - mosaic' - Modell von Singer und Nicolson (1972) zusammengefaßt wurden. Die Membran besteht aus einer fluiden Lipid - Doppelschicht, die in ihrer Lipid - Zusammensetzung stark asymmetrisch ist. Die Lipidmoleküle sind in der Ebene relativ frei beweglich, können die Membran aber praktisch nicht überqueren. In dieser zweidimensionalen Matrix sind viele verschiedene integrale Membranproteine gelöst, die die Membran zum Teil ganz überbrücken und unterschiedlichste Funktionen ausüben (Fig. 2c). Integrale Membranproteine zeichnen sich durch einen hohen Anteil an hydrophoben Aminosäureresten aus, die den Einbau in die Lipidmembran stabilisieren. Andere Proteine sind der Membran nur locker angelagert. Entscheidend

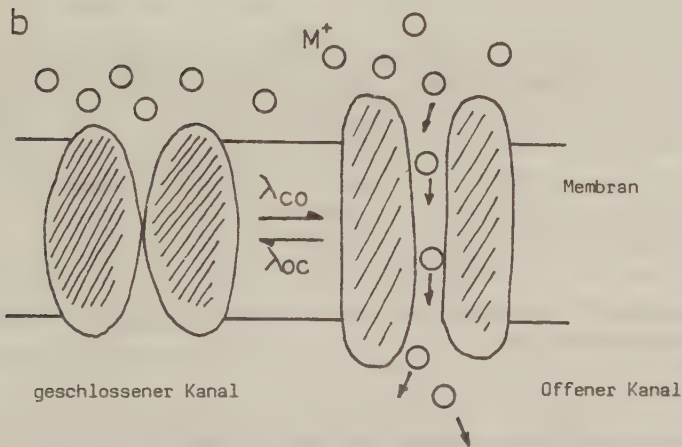
ist, daß die Membran keine statische Barriere ist, sondern ein äußerst komplexes, zweidimensionales System darstellt, welches auf mannigfaltige Weise an den biochemischen Abläufen der Zelle beteiligt ist.

Zur Erhöhung der Ionenleitfähigkeit einer solchen Lipidmembran wurden im wesentlichen zwei Mechanismen diskutiert (Läuger 1981). Als Carrier werden lipidlösliche Substanzen bezeichnet, welche Ionen binden und von der hydrophoben Umgebung im Inneren der Membran abschirmen können (Fig. 3a). Carrier transportieren Ionen gemäß ihrem elektrochemischen Gradienten durch die Membran, wobei die erreichbaren Leitfähigkeiten aber durch die Diffusions- und Bindungsraten begrenzt sind. Kanäle sind Strukturen, die eine wassergefüllte oder hydrophile Pore in der Membran bilden und so eine sehr hohe Durchtrittsrate für Ionen ermöglichen (Fig. 3b). Beide Arten von Ionen-transport lassen sich an Modellsystemen und speziell an synthetischen planaren Lipidmembranen demonstrieren. Beide Transportmechanismen können ionenselektiv sein, und bei Kanälen ist darüberhinaus häufig eine gezielte Steuerung durch das Membranpotential oder durch Agonisten möglich.

Eine Reihe von Befunden deutet darauf hin, daß Kanäle, und nicht Carrier, die elektrophysiologisch charakterisierten Leitfähigkeitsänderungen erregbarer Zellmembranen bewirken (Bergmann und Meves 1981). Die verschiedenen Kanälen zugeordneten Ionenströme sind praktisch unabhängig voneinander und lassen sich einzeln durch spezifische Toxine blockieren, ohne andere Ströme zu beeinflussen. Die hierzu erforderlichen Toxinmengen sind sehr klein, so daß die Membran nur an wenigen Stellen die Ionen hindurchtreten läßt. Jedes einzelne Kanalmolekül muß also einen großen Strom transportieren, der mit einem Carrier - Mechanismus nicht vereinbar wäre. Analysen des Stromrauschens von Membranen zeigen ebenfalls, daß eine begrenzte Anzahl von Kanälen mit recht hohem Leitwert die Ionen durch die Membran treten läßt. Heute ist weitgehend akzeptiert, daß Ionenkanäle durch integrale Membranproteine gebildet werden, welche die Lipidschicht überbrücken und eine hydrophile Pore bilden können. Entsprechende Proteine können aus Membranen herausgelöst werden und behalten dabei einen Teil ihrer relevanten Eigenschaften, wie zum Beispiel die Fähigkeit, spezifische Toxine zu binden oder die Leitfähigkeit von Lipidmembranen zu erhöhen (s. z.B. Boheim et al. 1981).



Transport von Metallionen M^+ durch eine Membran mittels eines neutralen Carriers (nach Lugler 1981)



Transport von Metallionen M^+ durch einen Kanal

Fig. 3. Mechanismen des Ionentransports durch eine Membran.

1.2. Einzelkanäle

Gegen Ende der siebziger Jahre wurden zwei revolutionäre Methoden entwickelt, die einen direkten Nachweis der Ionenkanäle in Membranen erlauben. Diese sind die Rekonstitution von Membranfragmenten in künstliche Lipid - Bilayer sowie die Patch - Clamp - Technik.

Durch die Fusion von Membranfragmenten mit planaren Lipidmembranen (Miller 1978, Boheim et al. 1981) sowie durch direkten Einbau von Proteinen in solche Bilayer (Schindler und Quast 1980) ist es möglich, die elektrischen Eigenschaften von einzelnen Ionenkanälen zu messen. Fig. 4 zeigt schematisch den Aufbau der Meßapparatur sowie typische Stromfluktuationen. Diskrete Stromsprünge signalisieren das Öffnen oder Schließen eines Ionenkanals. Solche Versuche können auch mit isolierten, durch Affinitätschromatographie gereinigten und in Liposomen eingebauten Membranproteinen durchgeführt werden. Dies erlaubt die eindeutige Zuordnung eines physiologischen Ionenstroms zu einem bestimmten biochemisch identifizierten Protein. (Boheim et al. 1981).

Im Gegensatz zu Rekonstitutionsversuchen erlaubt die von Neher, Sakmann und Mitarbeitern (Neher und Sakmann 1976, Hamill et al. 1981) entwickelte Patch - Clamp - Technik die Beobachtung von Einzelkanälen in ihrer natürlichen Membran. Eine feuerpolierte Glaspipette mit etwa 1 μm Spitzendurchmesser wird auf die Zelloberfläche gesetzt. Durch leichtes Ansaugen entsteht eine elektrisch dichte Verbindung zwischen Membran und Glasoberfläche, die einen kleinen Membranfleck, den 'patch', vom Rest der Membran isoliert. Bild 5 illustriert die Methode. Wieder zeigen sich einzelne diskrete Stromfluktuationen, die sich überzeugend durch das Öffnen und Schließen einzelner Ionenkanäle erklären lassen.

Am Rande sei hier bemerkt, daß auch künstliche Lipidmembranen auf Patch - Pipetten hergestellt werden können. Dies führt zu einer Reihe von experimentellen Vorteilen und illustriert die grundlegende Verwandtschaft beider Techniken zur Einzelkanal - Ableitung (Hanke et al. 1983).

Die Methoden der Einzelkanal - Ableitung haben der Elektrophysiologie eine neue molekulare Ebene eröffnet und erlauben Untersuchungen, die vorher nicht denkbar waren. Die Wirkung von Pharmaka und Toxinen läßt sich direkt nachweisen, die Selektivität eines Kanals kann ohne Störung durch andere

Kanalströme untersucht werden, und die Schaltkinetik der Kanäle wird unmittelbar zugänglich. Die Möglichkeiten sind sicher noch lange nicht ausgeschöpft.

Bereits heute lassen sich aber zwei offenbar allgemein gültige Ergebnisse festhalten. Erstens öffnen Ionenkanäle sich stets in einem Alles- oder Nichts- Verfahren, wobei die stetigen Antworten des integralen Systems durch die Summierung vieler statistisch unabhängiger Einzelereignisse erklärt werden. Zweitens ist das Schaltverhalten der Einzelkanäle wesentlich komplizierter, als es bisher vermutet wurde. Typische Kanäle zeigen eine ganze Reihe von Zuständen mit unterschiedlichem Zeitverhalten. Dadurch wird es wahrscheinlich, daß die bisher gemessenen Ionenströme nicht immer eindeutig einem Einzelkanal - Protein zugeordnet werden können. In manchen Fällen kann ein kompliziert geschalteter Ionenkanal zu mehreren 'Strömen' mit unterschiedlichem Zeitverhalten beitragen; andererseits mag sich ein kompliziert verlaufender 'Strom' erst durch die Überlagerung mehrerer Ionenkanäle erklären lassen. Der bisher leider häufige Sprachgebrauch, elektrophysiologisch gemessene Ionenströme als 'Kanäle' zu bezeichnen, dürfte dabei noch viel Verwirrung stiften. Es kommt hinzu, daß der durch einen Einzelkanal fließende Strom je nach Selektivität des Kanals von mehreren Ionensorten getragen werden kann. In dieser Arbeit bezeichnet der Begriff 'Kanal' stets den einzelnen Ionenkanal, und die integralen Stromflüsse, die in klassischen elektrophysiologischen Versuchen gemessen werden, werden als 'Membranstrom' bezeichnet.

Fig. 4 (nächste Seite). Rekonstitution von Ionenkanälen durch Fusion von Membranfragmenten mit einem planaren Lipid - Bilayer.

Die künstliche Lipidmembran überspannt ein Loch in einem Teflon - Septum, welches zwei mit Salzlösung gefüllte Kompartimente trennt. Bilayer können a) aus einem Tropfen Decan - Lipid - Lösung (Mueller - Rudin - Verfahren, Mueller et al. 1962) oder b) aus zwei Lipid - Monoschichten (Mueller - Montal - Verfahren, Montal und Mueller 1972) hergestellt werden. Nach Zugabe von Membranfragmenten zur Meßlösung werden nach Anlegen einer Spannung U_m diskrete Stromfluktuationen beobachtet. Die hier gezeigten Signale entstanden nach Zugabe von Membranfragmenten aus dem elektrischen Organ von Torpedo, welche reich an Acetylcholin - Rezeptor sind, zu einem Bilayer unterhalb der Haupt - Phasenumwandlungstemperatur des Lipids. Lipid. 1- Stearoyl 3- Myristoyl 2 - Phosphatidylcholin, mit Cholesterol dotiert. Salzlösung (in mM): 1000 KCl, 4 CaCl₂, 2 MgCl₂, 4 NaCl, 4 Tris - Puffer, pH 7.2 und 4 μ M Carbamylcholin als Agonist. Membranspannung -100 mV (nähere Angaben s. Boheim et al. 1982).

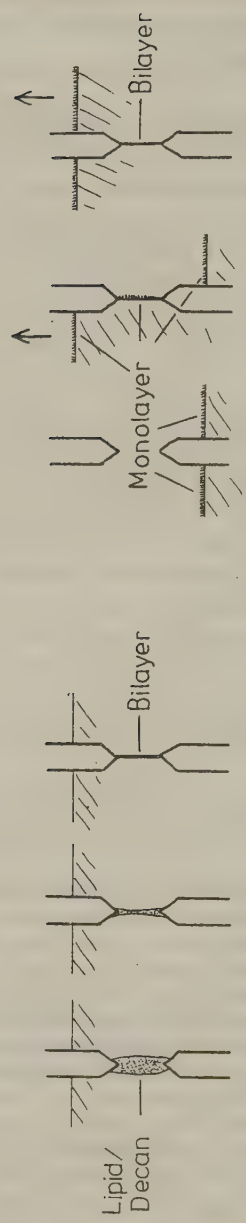
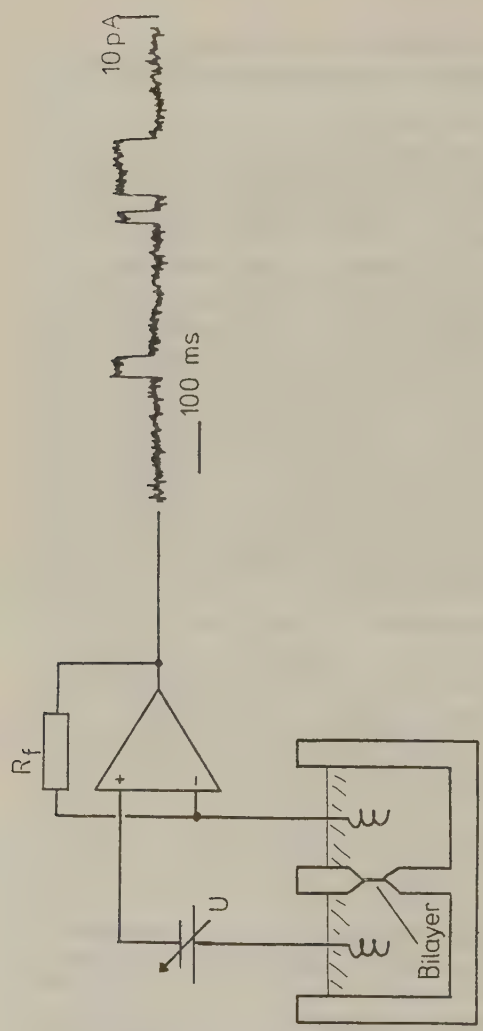


Fig. 4

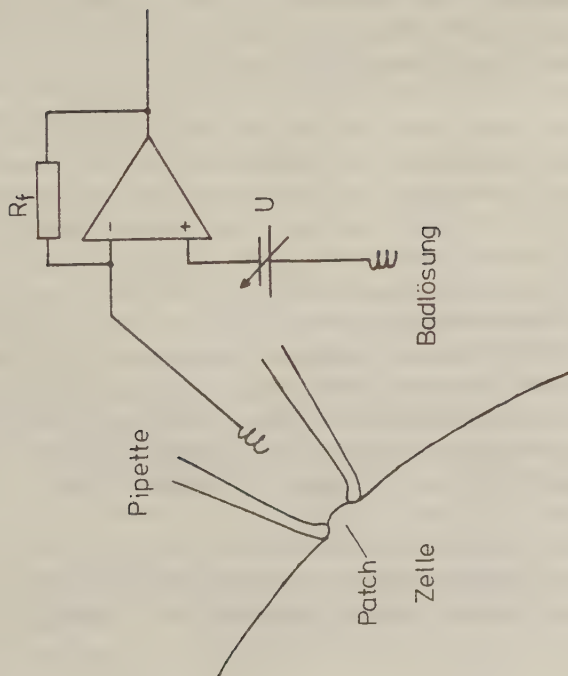


Fig. 5. Ableitung von Einzelkanalströmen mit der Patch - Clamp - Methode.

Gezeigt sind Fluktuationen des Acetylcholin - Rezeptor - kanäle, welche durch $10 \mu\text{M}$ Carbamylcholin in der Pipettenlösung induziert wurden. On - Cell - Patch. Salzlösung im Bad und in der Pipette (in mM): 150 NaCl , 4 KCl , 1 MgCl_2 , 1 CaCl_2 , 3 HEPES - Puffer, pH 7.2. Angelegte Spannung -40 mV (aufgrund des Ruhepotentials der Zelle beträgt die Membranspannung am Patch etwa -100 mV).

1.3. Thema dieser Arbeit

In den wenigen Jahren seit ihrer Einführung hat die Patch - Clamp - Methode einen Siegeszug angetreten, der sich auch in einer großen Zahl veröffentlichter Einzelkanal - Untersuchungen dokumentiert. Die Möglichkeiten, detaillierte Aussagen über die Kinetik und das molekulare Schaltverhalten von Ionenkanälen zu erhalten, wurden dabei aber eigentlich nie voll ausgenutzt. In fast allen Arbeiten beschränken sich die Autoren darauf, die kinetischen Eigenschaften der Kanäle qualitativ, oder allenfalls durch die Angabe einer mittleren Öffnungswahrscheinlichkeit, zu charakterisieren. Deshalb erschien es mir wichtig, Konzepte für eine quantitative statistische Analyse der Einzelkanalfluktuationen zu entwickeln. Dies sollte in der vorliegenden Arbeit versucht und an einem speziellen Ionenkanal exemplarisch angewendet werden. Der Calcium - abhängige Kalium - Kanal am Skelettmuskel der Ratte erschien hierfür aus drei Gründen hervorragend geeignet. Er ist in kultivierten Myotubes gut und reproduzierbar erhältlich. Auf Grund seines charakteristischen Erscheinungsbildes ist er leicht zu identifizieren und wegen seiner hohen Leitfähigkeit kann er ohne extremen meßtechnischen Aufwand untersucht werden. Schließlich ist er von großer physiologischer Relevanz, denn ein Ca^{++} - abhängiger Kalium - Ausstrom wird an vielen Präparaten beobachtet (Schwarz und Passow 1983).

Im ersten Teil dieser Arbeit wird deshalb eine Beschreibung des Ionenkanals mit den Begriffen der Theorie der kontinuierlichen Markov - Prozesse vorgelegt, wobei ich mich eng an die grundlegenden Arbeiten von Colquhoun und Hawkes (1977,1981,1982) anschließe. Davon ausgehend wird versucht, einen Ansatz für die praktische Analyse von Einzelkanalfluktuationen zu entwickeln. Die begrenzte Zeitauflösung der realen Daten läßt eine Beschreibung durch diskrete Markov - Ketten zweckmäßig erscheinen, die zugleich einer maschinellen Datenverarbeitung sehr entgegenkommt. Zu jedem Schritt der theoretischen Diskussion wurden deshalb Computerprogramme erstellt, welche einerseits Kanalfluktuationen gemäß ihrer theoretischen Beschreibung simulieren und andererseits die praktische maschinelle Durchführung der statistischen Analyse von Einzelkanalfluktuationen erlauben.

Im zweiten Teil werden experimentelle Untersuchungen am Calcium - abhängigen Kalium - Kanal von kultivierten Skelettmuskelzellen der Ratte beschrieben, welche von mir im Herbst 1980 bei Privatdozent Dr. B. Sakmann in Göttingen begonnen und in Bochum in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. G. Boheim

weitergeführt wurden. Dabei stellte sich heraus, daß dieser Ionenkanal ein sehr kompliziertes System mit einer ganzen Reihe von Zuständen ist. Fig. 6 zeigt typische Stromfluktuationen dieses Kanals bei +40 mV Spannung. Wie andere Ionenkanäle auch, ist der Kanal in Episoden oder 'Bursts' aktiv, die ihrerseits zu Gruppen oder 'Clusters' zusammengefaßt erscheinen. Zusätzlich treten sehr kurze und kaum auflösbare Schließungen auf, die als 'Flicker' bezeichnet werden. Daneben sind auch weitere Zustände dieses Kanals beobachtet worden (Barrett et al. 1982, Methfessel und Boheim 1982), die aber relativ selten auftreten und deshalb bisher nicht systematisch untersucht werden konnten.

Die gemessenen Einzelkanalfluktuationen wurden mit Hilfe des Computers einer statistischen Analyse unterzogen, um quantitative Aussagen über die Kinetik des Einzelkanals zu erhalten. Die eingehende statistische Analyse mußte in dieser Arbeit auf die wichtigste Untermenge der Kanalzustände beschränkt werden, nämlich das Öffnen und Schließen des Kanals während seiner aktiven Phasen (innerhalb der Bursts). Für diese Reaktionsschritte wurden die Gleichgewichtsverteilung und die mittleren Zustandslebensdauern bei verschiedenen Spannungen und Calciumkonzentrationen ermittelt und ein Modell entwickelt, welches das Verhalten des Kanals quantitativ richtig beschreibt. Dieses Aktivierungs - Blockade - Modell enthält wichtige neue Vorstellungen zum Mechanismus des Schaltens von Kanälen, die für Ionenkanäle allgemein von Bedeutung sein dürften.

Fig. 6 (nächste Seite). Typische Stromfluktuationen eines Calcium - abhängigen Kalium - Kanals bei +40 mV (Meßbedingungen s. Fig. 19). Der Kanal zeigt mehrere in ihrer Lebensdauer verschiedene geschlossene Zustände, und seine Aktivität wird dadurch zu Bursts und Clusters gruppiert. Die kurzen Flicker - Schließungen sind nicht vollständig auflösbar und werden in dieser Arbeit zum offenen Zustand hinzugerechnet. Das gesamte Erscheinungsbild ist dem des Acetylcholin - Rezeptorkanals bei hoher Agonistenkonzentration (Sakmann et al. 1980) sehr ähnlich, so daß die Bezeichnungen der Zustände von dort entlehnt wurden.

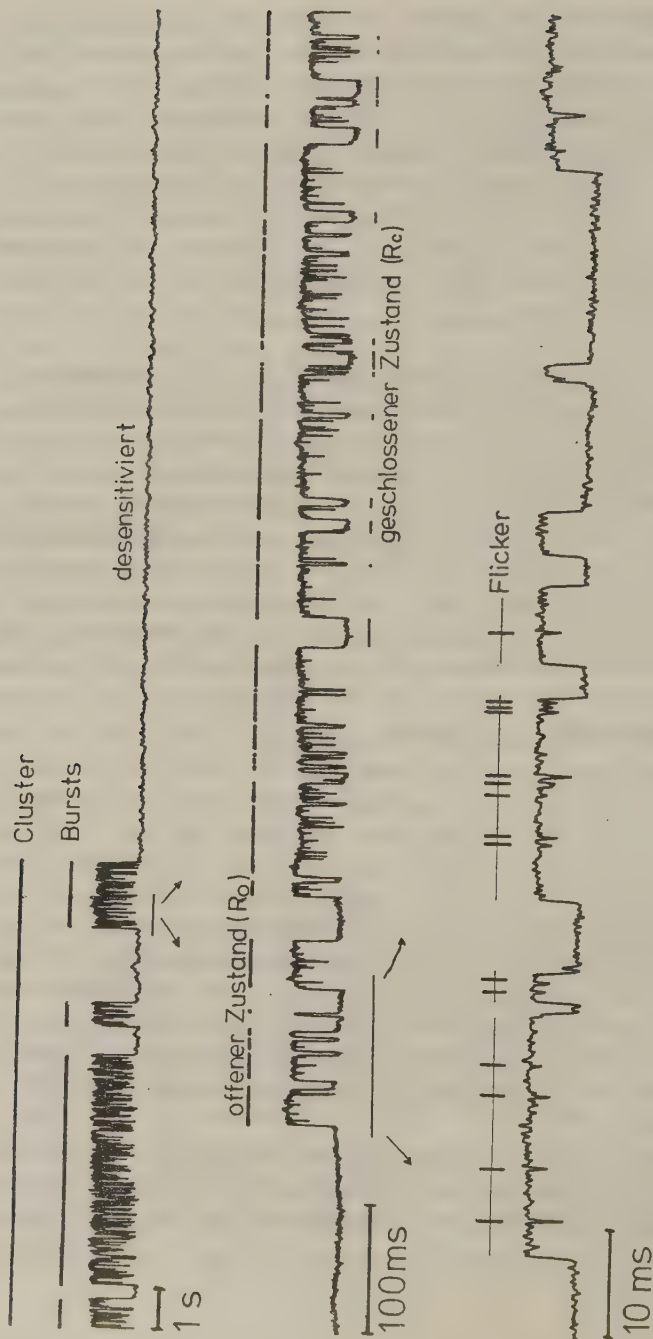


Fig. 6

2. Theorie der Einzelkanalfluktuationen

In diesem Teil der Arbeit werden die theoretischen Grundlagen dargestellt, auf die sich die statistische Analyse von Einzelkanalfluktuationen stützt. Zuerst wird der Ionenkanal in Hinblick auf sein kinetisches Verhalten mit mathematischen Begriffen beschrieben und gezeigt, daß alle kinetisch relevanten Eigenschaften des Kanals in einer Matrix zusammengefaßt werden können. Solche Systeme werden in der Theorie der Markov - Prozesse behandelt, die deshalb kurz vorgestellt wird. Dabei wird besonders auf Möglichkeiten zur Vereinfachung eines komplizierteren Systems eingegangen. Die damit eng verwandte Theorie der diskreten Markov - Ketten ist für die Praxis wichtig und wird darum ebenfalls kurz vorgestellt, und der formale Zusammenhang zwischen diskreter Kette und kontinuierlichem Prozeß wird gezeigt. Dann werden die wichtigsten Anwendungen der Theorie kurz und an Beispielen vorgestellt. Diese sind die Vorhersage des Kanalverhaltens aus dem Reaktionsschema, die Simulation von Einzelkanalfluktuationen, und die statistische Analyse von Meßdaten. Anschließend wird eine Reihe von möglichen Reaktionsschemata für Ionenkanäle besprochen, die zu dem von Methfessel und Boheim (1982) entwickelten Aktivierungs - Blockade - Modell des Calcium - abhängigen Kalium-Kanals hinführt.

2.1. Grundlagen

2.1.1. Mathematische Beschreibung des Ionenkanals

Die statistische Analyse von Einzelkanalfluktuationen basiert auf der Annahme, daß das kanalbildende Proteinmolekül ein System darstellt, welches über Konformationsänderungen eine Reihe von verschiedenen Zuständen annehmen kann. Die Menge dieser Zustände wird allgemein mit

$$(4) \quad S = \{ R_i \mid i = 1, 2, \dots, n \}$$

bezeichnet, wobei n die Anzahl der möglichen Zustände ist. Von diesen Zuständen sind manche mit der Bildung einer leitenden Pore verbunden ('offene' Zustände) und andere nicht ('geschlossene' Zustände). Ganz allgemein kann jedem Zustand des Kanals ein Leitwert g_i zugeordnet werden, der für geschlossene Zustände null ist. Wenn von speziellen Zuständen die Rede ist, können an Stelle der Ziffern auch geeignete Buchstaben zur Bezeichnung der Zustände verwendet werden, wie zum Beispiel R_o = offener Zustand, R_c = geschlossener Zustand (= 'closed'), R_d = desensitivierter Zustand und so fort.

Damit der Zustand des Kanals zu jeder Zeit eindeutig definiert ist, müssen die Übergänge zwischen den Zuständen sehr viel schneller erfolgen als die typische Verweildauer in einem Zustand. Diese Voraussetzung scheint für alle bis heute untersuchten Ionenkanäle erfüllt zu sein. Bisher wurde - in den Grenzen der erreichbaren Zeitauflösung - noch nie ein langsames oder 'gleitendes' Schalten eines Ionenkanals gesehen. Vielmehr werden stets diskrete, rechteckige Leitwärtsänderungen gefunden, deren Anstiegszeiten durch die Eigenschaften des verwendeten Verstärkers und der Meßanordnung bestimmt werden.

Dann befindet sich das Kanalprotein - Molekül zu jeder Zeit t in einem seiner erlaubten Zustände. Die Wahrscheinlichkeit, den Kanal zur Zeit t im Zustand R_i anzutreffen, wird mit $p_i(t)$ bezeichnet. Die Funktionen $p_i(t)$ beschreiben das statistische Verhalten des Systems. Als Wahrscheinlichkeiten genügen sie den Bedingungen

$$(5) \quad 0 \leq p_i(t) \leq 1 \quad \text{und} \quad \sum_i p_i(t) = 1$$

(Hier gilt, wie in dieser ganzen Arbeit, daß sich alle Summen über die Menge der Kanalzustände erstrecken, sofern nichts anderes angegeben ist.) Ist der Zustand des Kanals zu einer Zeit $t = 0$ (zum Beispiel durch Messung) eindeutig festgelegt (z.B. auf R_k), dann gilt

$$(6) \quad p_i(0) = \delta_{ik} \quad .$$

Die Wahrscheinlichkeit des sicher vorliegenden Zustandes ist also eins, während die Wahrscheinlichkeiten der dadurch ausgeschlossenen Zustände null sind. Selbstverständlich sind auch andere Anfangsverteilungen möglich, bei denen zur Zeit $t = 0$ der Zustand nicht eindeutig festgelegt ist.

Die Übergangsraten aus einem Zustand R_i in einen anderen Zustand R_j werden mit λ_{ij} bezeichnet. Sie entsprechen genau den chemischen Reaktionsraten k_{ij} zwischen den molekularen Spezies R_i und R_j . Gemäß den Prinzipien der chemischen Raten-theorie (Alberty und Daniels 1979) wird angenommen, daß die Übergangsraten nur von äußeren Parametern wie z.B. der Temperatur, dem Membranpotential oder der Konzentration eines Agonisten, aber nicht explizit von der Zeit oder von früher durchlaufenen Zuständen abhängen. In anderen Worten: das Proteinmolekül hat kein 'Gedächtnis', sondern sein zukünftiges Verhalten ist allein durch seinen augenblicklichen Zustand bestimmt. Die zeitliche Entwicklung des Systems wird dann durch die

sogenannten Master - Gleichungen beschrieben:

$$(7) \quad \frac{dp_i(t)}{dt} = \sum_{j \neq i} p_j(t) \lambda_{ji} - p_i(t) \sum_{j \neq i} \lambda_{ij}$$

Dies ist ein System von n gekoppelten linearen Differentialgleichungen. Der erste Term auf der rechten Seite beschreibt den Zuwachs an Wahrscheinlichkeit durch mögliche Übergänge in den Zustand R_i hinein, und der zweite Term den Schwund durch Sprünge aus R_i heraus.

2.1.2. Einzelkanäle im chemischen Gleichgewicht

An dieser Stelle wird der Zusammenhang zwischen der statistischen Beschreibung von Einzelkanälen und der makroskopischen thermodynamischen Beschreibung eines Ensembles von Kanälen deutlich. Die beiden Darstellungen sind durch das für unabhängige Elementarprozesse gültige Postulat 'Zeitmittel gleich Scharmittel' einander äquivalent. Den Zuständen des Einzelkanals entsprechen im makroskopischen Bild die chemischen Spezies R_i , welche mit den Geschwindigkeitskonstanten k_{ij} ineinander übergehen. Anstelle der Zustandswahrscheinlichkeiten $p_i(t)$ werden die Konzentrationen der Reaktanden $C_i(t)$ betrachtet, die für Ionenkanäle in den Einheiten mol/cm^2 Membranfläche anzugeben sind. Der chemische Reaktionsverlauf wird durch das lineare Differentialgleichungssystem

$$(8) \quad \frac{dC_i(t)}{dt} = \sum_{j \neq i} C_j(t) k_{ji} - C_i(t) \sum_{j \neq i} k_{ij}$$

beschrieben, welches der Master - Gleichung des Einzelkanals analog ist. Für beliebig gewählte Anfangskonzentrationen erreicht die chemische Reaktion nach hinreichend langer Zeit ein Gleichgewicht. Die Gleichgewichtskonzentrationen der einzelnen Reaktanden erhält man aus den Bedingungen

$$(9) \quad \frac{dC_i(t)}{dt} = 0 \quad .$$

Im chemischen Gleichgewicht lassen sich keine makroskopischen Änderungen in den Konzentrationen der Reaktanden mehr nachweisen. Nach der thermodynamischen Theorie handelt es sich dabei aber um ein dynamisches Gleichgewicht. Es finden ständig Reaktionen statt, aber von jedem Reaktanden entsteht in jedem Zeitintervall im Mittel ebenso viel, wie zerfällt. Über sehr kurze Zeiträume treten dabei kleine Abweichungen von den Gleichgewichtskonzentrationen auf. Diese stochastischen Fluktuationen um das Gleichgewicht sind ein entscheidendes Postulat der statistischen Thermodynamik, sie können aber normalerweise nicht direkt sichtbar gemacht werden. In manchen experimentellen Systemen lassen sich solche Fluktuationen um einen

Mittelwert als Rauschen (z.B. einer elektrischen Größe) nachweisen. Für das einzelne Molekül in einem Ensemble von Ionenkanälen bedeutet dies, daß es auch unter Gleichgewichtsbedingungen seinen Zustand gemäß den vorgegebenen Geschwindigkeitskonstanten immer wieder wechselt. Lediglich die mittlere Aufenthaltswahrscheinlichkeit in den verschiedenen Zuständen ist durch die Gleichgewichtsbedingungen festgelegt.

Hier kommt der Analyse von einzelnen Ionenkanälen über den Rahmen der Biologie hinaus eine wichtige fundamentale Bedeutung zu. Sie bietet die bisher wohl einmalige Möglichkeit, die Gleichgewichtsfluktuationen eines individuellen Makromoleküls - des Kanalproteins - mit der Meßsonde des Ionenstroms unmittelbar zu beobachten und die Übereinstimmung mit den Aussagen der statistischen Thermodynamik direkt zu überprüfen.

2.1.3. Die Matrix Q

Die Master - Gleichungen des Einzelkanalsystems lassen sich mit Hilfe der Matrizen Schreibweise elegant zusammenfassen. Die Zustandswahrscheinlichkeiten $p_i(t)$ bilden dazu einen Reihenvektor:

$$(10) \quad \underline{p}(t) = (p_1(t), p_2(t), \dots, p_n(t)) .$$

Die Übergangsmatrix

$$(11) \quad Q = \begin{pmatrix} q_{11} & \dots & q_{1n} \\ \vdots & & \vdots \\ q_{n1} & \dots & q_{nn} \end{pmatrix}$$

wird definiert durch

$$(12a,b) \quad q_{ij} = \lambda_{ij} \text{ für } i \neq j \quad \text{und} \quad q_{ii} = - \sum_{j \neq i} q_{ij}$$

Die Master - Gleichung hat dann die Form

$$(13) \quad \dot{\underline{p}}(t) = \underline{p}(t) Q$$

Die Matrix Q faßt die Master - Gleichungen des untersuchten Systems in kompakter Form zusammen. Sie enthält deshalb alle Information, die zur Beschreibung der Kinetik des Systems, seines Gleichgewichtszustandes und seiner Entwicklung aus einem beliebigen Anfangszustand heraus erforderlich ist. Die nichtdiagonalen Matrixelemente von Q sind als Geschwindigkeitskonstanten nichtnegative reelle Zahlen. Durch die Definition der Diagonalelemente verschwinden die Reihensummen der Matrix. Sie ist folglich singular und besitzt den Eigenwert null.

Die Gestalt der Matrix Q eines Einzelkanals spiegelt das chemische Reaktionsschema wieder. A priori unterliegt das Schema keinen Einschränkungen, alle Übergänge sind also prinzipiell erlaubt. Sind durch die Annahme eines speziellen Reaktionsschemas einzelne Übergänge nicht möglich, so ist das entsprechende Matrixelement null. Im häufig angenommenen Fall eines linearen Reaktionsschemas



nimmt die Matrix Q die besonders einfache Tridiagonalform an.

Oft hängen Geschwindigkeitskonstanten von äußeren Parametern ab, wie zum Beispiel der Temperatur, der Membranspannung oder der Konzentration eines Agonisten. Dann werden die entsprechenden Matrixelemente, und somit auch die Matrix selbst, Funktionen dieser Parameter. Beispiele für Q -Matrizen zu verschiedenen Reaktionsschemata finden sich bei der Diskussion spezieller Kanalmodelle.

Es stellt sich nun die Frage, wie sich einerseits aus der Matrix Q konkrete Aussagen über das Verhalten des Ionenkanals machen lassen, und wie sich andererseits die Matrix Q als die vollständige Beschreibung des Systems aus experimentellen Beobachtungen ermitteln läßt. Diese Fragen werden in den nächsten Abschnitten erörtert.

2.2 Theorie der Markov - Prozesse

Ein System, welches nicht streng deterministisch, sondern zufällig gemäß vorgegebenen Wahrscheinlichkeiten eine Folge von Zuständen durchläuft, wird in der mathematischen Literatur als ein 'stochastischer Prozeß' bezeichnet. Markov - Prozesse zeichnen sich unter den stochastischen Prozessen dadurch aus, daß die Übergangswahrscheinlichkeiten nur vom momentanen Zustand, und nicht von früher durchlaufenen Zuständen des Systems abhängen. Ein stationärer Prozeß liegt dann vor, wenn die Übergangsraten selbst nicht explizit von der Zeit abhängen. Weiter wird unterschieden zwischen diskreten Zustandsfolgen, die oft als Ketten bezeichnet werden, und kontinuierlichen Prozessen, bei denen zu jedem beliebigen Zeitpunkt eine Zustandsänderung auftreten kann. Demnach handelt es sich bei einem Ionenkanal, wie er im letzten Abschnitt beschrieben wurde, um einen stationären Markov - Prozeß in kontinuierlicher Zeit. Bei der Betrachtung der statistischen Eigenschaften von Ionenkanälen

kann und sollte deshalb auf die mathematische Theorie solcher Prozesse zurückgegriffen werden.

Die Theorie der Markov - Prozesse ist ein sehr aktives und noch keineswegs abgeschlossenes Gebiet der mathematischen Forschung. Daneben haben besonders diskrete Markov - Ketten bereits verbreitete Anwendung in vielen Gebieten gefunden, darunter Genetik und Populationsbiologie, Soziologie, Wirtschaftswissenschaften und Management. Dabei entstand eine sehr umfangreiche und unübersichtliche Literatur, die, auch durch die Vielfalt der Notationen, nicht ganz leicht zugänglich ist. Als allgemeine Einführungen habe ich vor allem die Werke von Chung (1967, 1979), Ferschl (1970), Karlin und Taylor (1975) und Kemeny und Snell (1976) verwendet. Hier können lediglich einige der für die Einzelkanalanalyse wesentlichen Ergebnisse der Theorie kurz referiert werden. Für mathematische Beweise oder eine vollständige Darstellung muß auf die angegebene Fachliteratur verwiesen werden.

2.2.1. Kontinuierliche Markov - Prozesse

Ein Markov - Prozeß wird durch einen Zustandsraum S , eine Übergangsmatrix Q und einen Anfangsvektor $p(0)$ gegeben, wie sie im letzten Abschnitt definiert wurden. Die Anzahl der Zustände soll dabei endlich (und, in der Praxis, klein) sein. Prinzipiell können Markov - Prozesse auch in unendlichen oder sogar kontinuierlichen Zustandsräumen betrachtet werden. Dabei treten aber einerseits mathematische Probleme auf, andererseits sind solche Fälle für Ionenkanäle nicht relevant.

Eine Reihe von wichtigen Aussagen läßt sich direkt aus der Matrix Q herleiten. Wie bereits erwähnt, ist Q konstruktionsbedingt singulär und besitzt den Eigenwert 0 (null). Es sei angenommen, daß 0 nur einmal als Eigenwert auftritt. Dann läßt sich jeder Zustand aus jedem anderen Zustand in einer endlichen Zeit erreichen und der Prozeß heißt 'regulär'. Andernfalls würde der Prozeß im Laufe der Zeit in mehrere unabhängige Prozesse zerfallen oder 'absorbierende' Zustände aufweisen, die nicht wieder verlassen werden können. Solche absorbierenden Zustände würden einer irreversiblen Änderung (Denaturierung, Zerstörung) des Ionenkanals entsprechen und werden deshalb hier nicht betrachtet.

Der rechte Eigenvektor zum Eigenwert null ist ein Spaltenvektor, dessen Elemente alle 1 sind. Dies ist eine Folge von Gl. 12. Viel interessanter ist der linke (Reihen-) Eigenvektor $a = (a_1, a_2, \dots, a_i)$ zum Eigenwert 0.

Bei geeigneter Normierung des Vektors gilt

$$(15a,b) \quad 0 \leq a_i \leq 1 \quad \text{und} \quad \sum_i a_i = 1 \quad ,$$

die Elemente a_i sind also Wahrscheinlichkeiten. Sie geben die stationäre Zustandsverteilung des Prozesses an, also die über lange Zeiträume gemittelten Aufenthaltswahrscheinlichkeiten in den einzelnen Zuständen, und entsprechen damit den Gleichgewichtskonzentrationen der makroskopischen Beschreibung.

Die negativen Diagonalelemente der Matrix, $-q_{ii}$ sind die Geschwindigkeitskonstanten für das Verlassen des Zustandes R_i . Folglich ist die mittlere Verweildauer im Zustand R_i gegeben durch

$$(16) \quad \tau_i = -1/q_{ii}$$

und die Lebensdauern des Zustandes R_i sind exponentiell verteilt gemäß

$$(17) \quad N(t) = N(0) \exp(q_{ii} \cdot t) \quad .$$

Die zeitliche Entwicklung des Prozesses aus einem gegebenen Anfangszustand $\underline{p}(0)$ heraus wird durch die Master - Gleichung, Gl. 13, beschrieben. Diese hat die formale Lösung

$$(18) \quad \underline{p}(t) = \underline{p}(0) \exp(Qt) \quad ,$$

die sich mit den Methoden der Matrizen - Algebra leicht berechnen läßt, sofern Q diagonalisierbar ist. Diese Bedingung ist sicher erfüllt, wenn die Eigenwerte von Q alle verschieden sind, was in der Regel auch der Fall ist. Ist Q diagonalisierbar, so gibt es eine Ähnlichkeitstransformation

$$(19) \quad Q = X^{-1} \Lambda X$$

welche Q in die Diagonalform überführt. Die Matrix Λ ist eine Diagonalmatrix, deren Elemente die Eigenwerte von Q sind. Die Spalten der Transformationsmatrix X sind die rechten Eigenvektoren von Q , und die Reihen der inversen Matrix X^{-1} sind die linken Eigenvektoren von Q . Darunter befindet sich auch die stationäre Zustandsverteilung $\underline{a}$, die also auf diese Weise berechnet werden kann.

Die Ähnlichkeitstransformation zur Diagonalform erlaubt es, Funktionen der Matrix Q explizit zu berechnen und die Master - Gleichung zu lösen. Jede durch eine Potenzreihenentwicklung darstellbare Funktion einer Diagonalmatrix wird gebildet, indem die Diagonalelemente einzeln durch die Funktion ersetzt werden:

$$(20) \quad \exp(\Lambda t) = \exp \begin{pmatrix} \lambda_1 t & 0 \\ & \ddots \\ 0 & \lambda_n t \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \exp(\lambda_1 t) & 0 \\ & \ddots \\ 0 & \exp(\lambda_n t) \end{pmatrix}$$

Der Funktionalzusammenhang zwischen Q und $\exp(Qt)$ bleibt durch die Ähnlichkeitstransformation unberührt. Folglich ist

$$(21) \quad \exp(Qt) = X^{-1} \cdot \exp(\Lambda t) \cdot X$$

Bei Kenntnis der Eigenwerte und Eigenvektoren von Q läßt sich also $p(t)$ für jede beliebige Anfangsverteilung $p(0)$ leicht bestimmen. Die Eigensysteme von Matrizen dieser Größe können in der Praxis mit geeigneten Computerprogrammen problemlos berechnet werden. Von mir wurden dazu die als "EISPACK" bekannten FORTRAN- Programme verwendet (Smith et al. 1976).

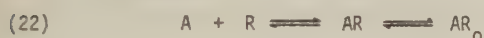
2.2.2 Vereinfachte Reaktionsschemata

Bei der praktischen Anwendung dieser Theorie auf Einzelkanäle kann es Schwierigkeiten geben, wenn die Geschwindigkeitskonstanten für verschiedene Teilreaktionen um mehrere Größenordnungen verschieden sind. In solchen Fällen ist es sinnvoll, die Matrix Q und damit das Reaktionsschema durch geeignete Annahmen zu vereinfachen. Zwei Fälle sollen hier genauer betrachtet werden.

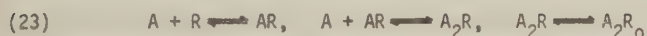
Der erste Fall ist, daß ein Reaktionsschritt sehr viel langsamer erfolgt als die anderen Reaktionsabläufe. Ein Beispiel hierfür ist das Auftreten langer 'desensitiverter' Intervalle zwischen den Bursts von Aktivität (vgl. Fig. 6). Dann ist es zweckmäßig, den desensitivierten Zustand 'absorbierend' zu machen, in dem in die entsprechende Reihe der Matrix Q lauter Nullen gesetzt werden. Die resultierende Matrix beschreibt einen abgewandelten Prozeß, welcher mit dem Eintritt in den absorbierenden Zustand zu Ende ist und in einem weiteren Experiment (d.h. mit dem Einsetzen des nächsten Bursts) neu gestartet wird. Alternativ dazu kann der desensitivierte Zustand aus der Matrix einfach weggelassen werden. Wenn die Eintrittsraten in diesen Zustand gegenüber den anderen Geschwindigkeitskonstanten klein ist, ändern letztere sich durch diese Maßnahme nur wenig. Die resultierende Matrix mit reduzierter Ordnung entspricht dann dem Prozeß, der durch ein Weglassen der langen Pausen in den experimentellen Daten dargestellt wird.

Der zweite, ebenfalls häufige Fall ist der, daß eine Teilreaktion sehr viel schneller als die übrigen Reaktionen erfolgt und insbesondere zeitlich

nicht mehr aufgelöst werden kann. Praktische Beispiele hierfür sind Bindungsreaktionen (z.B. eines Agonisten), welche sehr viel schneller als die Konformationsänderungen des Proteins equilibrieren, aber auch sehr schnelle Kanalfluktuationen wie die Flicker in Fig. 6. Die an den schnellen Reaktionsschritten beteiligten Zustände können dann zu einem Zustand zusammengefaßt werden. Voraussetzung dafür ist nur, daß die betroffenen Reaktionsschritte sehr viel schneller als andere Teilreaktionen erfolgen. Dann fluktuiert das System so schnell zwischen den beteiligten Zuständen, daß diese immer im Gleichgewicht stehen und - auf der Zeitskala der übrigen Teilreaktionen - nicht mehr unterscheidbar sind. Zur Illustration soll die Reaktion



des einfachen Agonisten - aktivierten Kanals betrachtet werden. Ist die Bindungsreaktion $A + R \rightleftharpoons AR$ sehr viel schneller als die Öffnungsreaktion $AR \rightleftharpoons AR_0$, so daß R und AR sofort nach Schließen des Kanals das Gleichgewicht erreichen, dann lassen sich diese zwei Zustände zu einem einzigen geschlossenen Zustand R_C zusammenfassen. Die tatsächliche (experimentell nicht auflösbare) Verteilung innerhalb des Zustandes R_C auf $A + R$ und AR ist die stationäre Gleichgewichtsverteilung des schnellen Prozesses. Natürlich können auch mehrere Zustände auf diese Weise zusammengefaßt werden, sofern alle Reaktionen innerhalb dieser Zustandsgruppe wesentlich schneller ablaufen als die schnellste Reaktion, die zum Verlassen der Gruppe führt. Zum Beispiel hat ein Agonisten - aktivierter Kanal mit zwei Bindungsstellen das Reaktionsschema



und eine Matrix Q mit 4x4 Einträgen. Sind aber die Bindungsreaktionen sehr schnell, so lassen sich die drei geschlossenen Zustände R, AR und A_2R zu einem einzigen geschlossenen Zustand R_C im vereinfachten Reaktionsschema



mit nur zwei Zuständen zusammenfassen. Die Geschwindigkeitskonstanten des vereinfachten Reaktionsschemas lassen sich leicht berechnen. Die Übergangsraten aus einem externen Zustand R_i in den kombinierten Zustand R_C hinein sind für m schnelle Zustände die Summen der einzelnen Geschwindigkeitskonstanten:

$$(25) \quad \lambda_{ic} = \lambda_{i1} + \lambda_{i2} + \dots + \lambda_{im}$$

Die Raten für das Verlassen des kombinierten Zustandes berücksichtigen dagegen die Anteile der Einzelzustände in der Gleichgewichtsverteilung a der schnellen Zustände:

$$(26) \quad \lambda_{ci} = a_1 \lambda_{1i} + a_2 \lambda_{2i} + \dots + a_m \lambda_{mi}$$

Zu beachten ist, daß die Geschwindigkeitskonstanten für den kombinierten Zustand von allen Parametern abhängen, die eine der zusammengelegten Teilreaktionen bestimmen. Bei mehreren sequentiellen Bindungsreaktionen kann dies zu Konstanten des vereinfachten Systems führen, die eine kompliziertere funktionelle Abhängigkeit von den entsprechenden Agonistenkonzentrationen zeigen.

2.2.3. Diskrete Markov - Ketten

In der Praxis werden die Stromfluktuationen zur Analyse auf dem Computer digitalisiert. Das Resultat wird, im Gegensatz zum Ionenkanal selbst, durch eine diskrete Markov - Kette beschrieben, weil über den Zustand des Kanals zwischen den digitalen Meßpunkten nichts bekannt ist. Die Theorie der diskreten Markov - Ketten ist eng mit der Theorie der kontinuierlichen Markov - Prozesse verwandt. Sie ist aber wesentlich einfacher, unter anderem deshalb, weil sich die meisten Berechnungen auf Matrix - Multiplikationen zurückführen lassen (Kemeny und Snell 1976). Wieder ist die Menge der Zustände, die der Kanal annehmen kann,

$$(G1.4) \quad S = \{ R_i \mid i = 1, 2, \dots, n \}$$

Im Gegensatz zum kontinuierlichen Prozeß kann der Zustand des Kanals nicht zu jedem beliebigen Zeitpunkt t angegeben werden. Vielmehr existiert eine diskrete Folge von Zeitpunkten, zu welchen der Zustand des Kanals überhaupt nur definiert ist. Im allgemeinen werden diese Zeitpunkte einfach mit den ganzen Zahlen gekennzeichnet. Bei der experimentellen Datenerfassung sind dies die Zeitpunkte, zu denen eine Analog - Digital - Wandlung vorgenommen wurde. Die Wahrscheinlichkeit, den Kanal zum Zeitpunkt k im Zustand R_i zu finden, wird mit $p_i(k)$ bezeichnet. Die Wahrscheinlichkeits - Verteilung zum Zeitpunkt k wird, ganz wie im kontinuierlichen Fall, durch einen Reihenvektor

$$(27) \quad \underline{p}(k) = (p_1(k), p_2(k), \dots, p_n(k))$$

gegeben. Natürlich gilt

$$(28a,b) \quad 0 \leq p_i(k) \leq 1 \quad \text{und} \quad \sum_i p_i(k) = 1, \quad ,$$

denn es handelt sich um Wahrscheinlichkeiten.

Die diskrete Markov - Kette wird nicht durch kontinuierliche Übergangsraten q_{ij} , sondern durch Übergangswahrscheinlichkeiten p_{ij} beschrieben. Befindet sich die Kette zu einem Zeitpunkt k im Zustand R_i , so gibt p_{ij} die Wahrscheinlichkeit an, daß zum nächsten Zeitpunkt $k + 1$ der Zustand R_j angenommen wird. Die Kette heißt stationär, wenn die p_{ij} nicht explizit von der Zeit abhängen; dies ist der einzige hier betrachtete Fall. Die Übergangswahrscheinlichkeiten lassen sich ebenfalls in einer Matrix zusammenschreiben:

$$(29) \quad P = \begin{pmatrix} p_{11} & \dots & p_{1n} \\ \vdots & & \vdots \\ p_{n1} & \dots & p_{nn} \end{pmatrix}$$

Da es sich auch hier um Wahrscheinlichkeiten handelt, gilt

$$(30a,b) \quad 0 \leq p_{ij} \leq 1 \quad \text{und für die Zeilensummen} \quad \sum_j p_{ij} = 1$$

Eine Matrix, die diesen Bedingungen genügt, heißt 'stochastisch'. Aus der Theorie der diskreten Markov - Ketten folgen wieder einige Ergebnisse, die hier nur kurz aufgeführt werden können. Für Einzelheiten und mathematische Beweise wird auch hier auf die Fachliteratur verwiesen (Kemeny und Snell 1976, Fritz et al. 1979).

Die diskrete Markov - Kette ist durch die Angabe der Übergangsmatrix P und einer Anfangsverteilung $\underline{p}(0)$ vollständig bestimmt. Das bedeutet, daß die Wahrscheinlichkeitsverteilung $\underline{p}(k)$ für alle $k > 0$ dadurch festgelegt ist. Aus der Definition der Übergangswahrscheinlichkeiten folgt das diskrete Analogon zur Master - Gleichung

$$(31) \quad \underline{p}(k+1) = \underline{p}(k) \cdot P, \quad ,$$

dies gibt die Wahrscheinlichkeitsverteilung zum jeweils nächsten Zeitpunkt an. Die Verteilung nach m Schritten ist gegeben durch

$$(32) \quad \underline{p}(k+m) = \underline{p}(k) \cdot P^m, \quad ,$$

die Mehrschritt - Übergangswahrscheinlichkeiten lassen sich also durch Potenzieren der Übergangsmatrix P erhalten. Die Diagonalelemente p_{ii} geben die Wahrscheinlichkeit an, mindestens einen weiteren Schritt lang im Zustand R_i zu verbleiben. Sie sind also anders (und einsichtiger!) definiert als die q_{ii} des kontinuierlichen Prozesses.

Die Zustände einer diskreten Markov - Kette lassen sich in Klassen aufteilen (Kemeny und Snell 1976, Chung 1967). Alle Zustände, die wechselseitig

voneinander in einer endlichen Anzahl von Schritten erreicht werden können, bilden eine Klasse. Die Zustände einer Klasse heißen 'transient', sofern keine Rückkehr in die Klasse möglich ist, nachdem sie einmal verlassen wurde. Ein 'absorbierender' Zustand kann nach seinem ersten Eintreten nicht wieder verlassen werden und entspricht damit einer irreversiblen Änderung (Zerstörung, Denaturierung) des Ionenkanals. Eine Markov - Kette heißt 'regulär', wenn ihre Zustände einer einzigen Klasse angehören. Das bedeutet, daß jeder Zustand in weniger als n Schritten aus jedem anderen Zustand erreicht werden kann. Mathematisch ist dies gleichbedeutend damit, daß für mindestens ein positives $m < n$ die Matrix P^m nur positive Einträge hat. Für eine reguläre Markov - Kette konvergiert die Folge der Matrizen P^m gegen eine Grenze

$$(33) \quad \lim_{m \rightarrow \infty} P^m = A$$

Die Matrix A enthält n identische Reihen

$$(34) \quad \underline{a} = (a_1, a_2, \dots, a_n) \quad .$$

Der Reihenvektor $\underline{a}$ ist ein linker Eigenvektor der Matrizen P , A sowie P^m für alle $m > 0$ zum Eigenwert 1. (Jede stochastische Matrix besitzt den Eigenwert 1). Es gilt also

$$(35) \quad \underline{a} \cdot P = \underline{a} \quad .$$

Hat die Kette zu einem beliebigen Zeitpunkt k die Wahrscheinlichkeitsverteilung $\underline{a}$, so bleibt diese für alle späteren Zeitpunkte erhalten, denn $\underline{a}$ ist die stationäre Wahrscheinlichkeitsverteilung der Kette. Aus einer beliebigen Anfangsverteilung $\underline{p}(0)$ konvergiert eine reguläre Kette quadratisch, d.h. in der Praxis recht schnell, gegen die stationäre Verteilung $\underline{a}$. Zugleich gibt $\underline{a}$ an, welchen Anteil eines längeren Beobachtungszeitraumes die Kette in jedem Zustand verbringt.

Die Lebensdauer eines Zustandes R_i wird definiert als die Anzahl aufeinanderfolgender Zeitpunkte in diesem Zustand. Die Verteilung dieser Lebensdauern läßt sich leicht angeben. Das Matricelement p_{ii} gibt die Wahrscheinlichkeit an, daß die bereits im Zustand R_i befindliche Kette für mindestens einen weiteren Zeitschritt in diesem Zustand bleibt. Die Wahrscheinlichkeit, daß der Prozeß den Zustand nach k Schritten immer noch nicht verlassen hat, ist also p_{ii}^k und die Wahrscheinlichkeit für ein Verlassen des Zustandes nach genau k Schritten ist $p_{ii}^k (1 - p_{ii})$. Die Folge dieser Wahrscheinlichkeiten für $k = 1, 2, \dots$ bildet in beiden Fällen eine geometrische Reihe, welche in halblogarithmischer Auftragung als eine Gerade mit der Steigung $\ln(p_{ii})$

dargestellt wird. Die Steigung ist natürlich immer negativ, da $p_{ij} < 1$ sein muß. Weil eine Einheit auf der diskreten Zeitskala genau einer Taktperiode Δt der A/D - Wandlung entspricht, ist die aus den digitalisierten Meßdaten mit dem Computer ermittelte apparente Lebensdauer des Zustandes R_i

$$(36) \quad \tau_i = -\Delta t / \ln(p_{ii})$$

2.2.4. Zusammenhang zwischen diskreter Kette und kontinuierlichem Prozeß
Obwohl der Ionenkanal mathematisch durch einen kontinuierlichen Markov - Prozeß beschrieben wird, liegen die experimentellen Ergebnisse in Form einer diskreten Markov - Kette mit einer vom Computer vorgegebenen Taktzeit Δt vor. Deshalb muß gezeigt werden, welcher Zusammenhang zwischen diesen beiden Darstellungen des Kanals besteht.

Mathematisch läßt sich die Matrix Q aus einer Folge von diskreten Matrizen P gewinnen, wenn die Taktzeit immer kürzer gemacht wird (Karlin und Taylor 1975).

$$(37a,b) \quad \lim_{t \rightarrow 0} \frac{P_{ij}(t)}{t} = q_{ij} \quad \text{für } i \neq j, \quad \lim_{t \rightarrow 0} \frac{P_{ii}(t) - 1}{t} = q_{ii}$$

Dieser Grenzübergang definiert den Zusammenhang zwischen P und Q. Experimentell wird P aber nicht für eine solche Folge von kleiner werdenden Zeiten vorliegen, zumal sich P für mit der Zeitauflösung vergleichbare Taktzeiten nicht sinnvoll bestimmen läßt. Ist die Matrix Q des kontinuierlichen Prozesses bekannt, so läßt sich für eine beliebige Taktzeit Δt die Übergangsmatrix P der diskreten Kette mit Hilfe von Gl. 18 sofort angeben. Im Zeitintervall Δt ändert sich die Zustandsverteilung des kontinuierlichen Prozesses gemäß

$$(38) \quad \underline{p}(t + \Delta t) = \underline{p}(t) \exp(Q \cdot \Delta t)$$

Die Einzelschritt - Übergangsmatrix der zugeordneten diskreten Markov - Kette für die Taktzeit Δt ist also

$$(39) \quad P(\Delta t) = \exp(Q \Delta t)$$

und kann über die Diagonalform der Matrix Q explizit berechnet werden, wie es auf Seite 21 vorgeführt wurde.

Ist für eine mit der Taktzeit Δt digitalisierte Messung die Matrix P ermittelt worden, so kann auf dieselbe Weise Q berechnet werden. Formal folgt nämlich für Matrizen, wie für skalare Größen, aus Gl. 39

$$(40) \quad Q = \frac{1}{\Delta t} \ln(P)$$

Die explizite Berechnung erfolgt wieder über die Diagonalform von P und erfordert, daß P diagonalisierbar ist. Aufgrund der Konvergenzkriterien für die Reihenentwicklung der Logarithmusfunktion müssen außerdem die Eigenwerte von P der Bedingung $0 \leq \lambda_i \leq 2$ genügen, die für stochastische Matrizen aber sowieso erfüllt ist. In der Praxis wird das ermittelte Resultat Q dann unbrauchbar, wenn die Eigenwerte von P sehr dicht zusammen liegen. Dies passiert vor allem dann, wenn die Taktzeit zu lang gewählt wurde, so daß P sich an die Grenzverteilung A zur Matrix Q annähert. Es gibt ebenfalls Probleme, wenn die Taktzeit viel zu kurz ist, so daß P nur unwesentlich von der Identitätsmatrix I verschieden ist. Die Berechnung läßt sich aber über einen sehr weiten Bereich von Taktzeiten mit guten Ergebnissen anwenden.

Wichtig ist auch der Zusammenhang zwischen den Zustands - Lebensdauern für beide Darstellungen. Die scheinbare Lebensdauer des Zustandes R_i der diskreten Kette war $-\Delta t / \ln(p_{ii})$. Die wirkliche mittlere Lebensdauer des Kanalzustandes ist dagegen $-1/q_{ii}$ des kontinuierlichen Prozesses. Der Zusammenhang zwischen den beiden Größen ist natürlich durch die Matrix - Beziehung Gl. 39 gegeben. Ist aber die Taktzeit Δt viel kürzer als die Lebensdauern aller Zustände, so ist $q_{ii} \approx \ln(p_{ii}) / \Delta t$, und die aus der diskreten Kette ermittelte Lebensdauer ist eine gute Näherung für die wirkliche Lebensdauer des Kanalzustandes.

2.3. Anwendungen

2.3.1 Charakterisierung der Kanalkinetik

Die erste wichtige Anwendung der Theorie auf Einzelkanäle ist, das Verhalten des Ionenkanals aus seinem Reaktionsschema vorherzusagen. Colquhoun und Hawkes haben in drei grundlegenden und ausführlichen Arbeiten (1977, 1981, 1982) die Theorie der Markov - Prozesse zur Beschreibung von Ionenkanälen herangezogen und gezeigt, welche Aussagen über das statistische Verhalten der Einzel - und Vielkanal - Stromfluktuationen für verschiedene Kanalmodelle gewonnen werden können. (Allerdings lassen Colquhoun und Hawkes den Experimentator im wesentlichen allein mit der Frage, wie denn nun aus den gemessenen Einzelkanalfluktuationen zurück auf die zugrundeliegenden physikalisch - chemischen Eigenschaften des Kanals geschlossen werden kann). Es ist im Abschnitt 2.2.1. bereits gezeigt worden, wie aus der Matrix Q die Gleichgewichtsverteilung und mittleren Lebensdauern der Zustände sowie die Funktionen $p_j(t)$ berechnet werden können. Zwei Beispiele sollen die Anwendung der Theorie weiter illustrieren. Diese sind die Berechnung des mittleren Kanalstromes und das Verhalten nach einem Spannungssprung.

Der Erwartungswert des durch den Kanal transportierten Stromes $i(t)$ kann aus der Wahrscheinlichkeitsverteilung $p(t)$ sofort bestimmt werden. Jedem Kanalzustand R_i entspricht ein transportierter Strom σ_i , dessen Wert natürlich von den speziellen experimentellen Bedingungen wie Ionenzusammensetzung, Membranpotential, u.s.w. abhängt. Für geschlossene Zustände hat σ_i den Wert null. Der Erwartungswert des vom Kanal transportierten Stromes ist dann

$$(41) \quad i(t) = \sum_i \sigma_i p_i(t)$$

Dieser Erwartungswert gibt an, welchen Beitrag der untersuchte Ionenkanal zum Gesamt - Membranstrom in einem klassischen elektrophysiologischen Experiment liefert. Der Membranstrom, der durch eine Population von N Kanälen derselben Art transportiert wird, ist einfach

$$(42) \quad I(t) = N \cdot i(t).$$

Für einen spannungsabhängigen Ionenkanal ist auch Q spannungsabhängig, denn die Matrixelemente, welche die spannungsabhängigen Reaktionsschritte beschreiben, sind Funktionen des Membranpotentials. Es soll nun die Antwort des Systems auf einen Spannungssprung von $U_m = U_1$ auf $U_m = U_2$ zur Zeit $t = 0$ betrachtet werden. Befindet sich der Kanal vor dem Spannungssprung im Gleichgewicht, so ist seine Wahrscheinlichkeitsverteilung im Moment des Sprungs die der Spannung U_1 entsprechende stationäre Verteilung $\underline{a}(U_1)$ zur Matrix $Q(U_1)$. Nach dem Spannungssprung wird das Verhalten des Systems durch die Matrix $Q(U_2)$ beschrieben. Die Relaxation des Systems zur neuen Gleichgewichtsverteilung $\underline{a}(U_2)$ wird dann durch den Ausdruck

$$(43) \quad p(t) = \underline{a}(U_1) \exp(Q(U_2) \cdot t)$$

beschrieben. Auf die gleiche Weise lassen sich natürlich auch kompliziertere Aufgaben (Antwort auf eine Folge von Spannungssprüngen, Überlagerung von mehreren unabhängigen Kanälen, usw.) bearbeiten. Es können auch noch weitere Parameter des Prozesses bestimmt werden. Die Verteilung der Verweilzeiten in einem ausgewählten Teil der Zustände (z.B. der Menge aller geschlossenen Zustände) ist im allgemeinen eine Summe aus mehreren Exponentialfunktionen (Chung 1967, Colquhoun und Hawkes 1982). Interessant ist auch die Frage nach der Bedeutung der weiteren Eigenwerte von Q . Ihre Kehrwerte sind Relaxationszeiten, die die Annäherung des Prozesses an die Gleichgewichtsverteilung beschreiben (Fritz 1979) und können deshalb prinzipiell aus Rausch- oder Autokorrelationsanalysen bestimmt werden (Colquhoun und Hawkes 1977).

2.3.2. Simulation von Einzelkanalfluktuationen

Eine zweite Anwendung der Theorie ist, mit Hilfe des Computers für ein vorgegebenes Reaktionsschema synthetische Kanalfluktuationen zu erzeugen. Solche simulierten Meßdaten sind zur Illustration von Reaktionsschemata und zum qualitativen Vergleich mit experimentell gewonnenen Fluktuationen gut geeignet. Von mir wurden sie vor allem verwendet, um die entwickelten Verfahren zur statistischen Analyse der Meßdaten mit Modellfluktuationen zu testen, für welche die zu ermittelnden Parameter bereits bekannt waren.

Um Einzelkanalfluktuationen zu simulieren, wird zuerst das Reaktionsschema auf die beschriebene Weise in Form einer Q- Matrix dargestellt. Dann wird für die gewünschte Taktzeit Δt gemäß Gl. 39 die Matrix P der zugeordneten diskreten Kette gebildet. Weiter wird jedem Zustand des Systems eine Signalamplitude σ_i zugewiesen. Das von mir erstellte FORTRAN - Programm MCHAIN erzeugt aus diesen Eingaben eine Folge von Datenpunkten, indem aus dem jeweils letzten Schritt mit Hilfe eines internen Zufallszahlen - Generators der Zustand zum folgenden Zeitpunkt gemäß der Übergangsmatrix P festgelegt wird. Die Folge von Datenpunkten kann gespeichert oder über den Digital - Analog - Ausgang des Rechners extern zur Verfügung gestellt werden.

Zur Illustration werden zwei besonders einfache Beispiele gezeigt. Für den Kanal mit nur zwei Zuständen ist das Reaktionsschema $R_c \rightleftharpoons R_o$. Für die angenommenen Geschwindigkeitskonstanten $\lambda_{co} = 10.0 \text{ s}^{-1}$ und $\lambda_{oc} = 50.0 \text{ s}^{-1}$ ist die Matrix

$$Q = \begin{pmatrix} -50.0 & 50.0 \\ 10.0 & -10.0 \end{pmatrix}$$

Die für eine Taktzeit von $\Delta t = 1 \text{ ms}$ erzeugten Testfluktuationen sind in Fig. 7a zu sehen. Als zweites Beispiel soll derselbe Kanal mit einem zusätzlichen Flicker - Prozeß versehen werden. Das Reaktionsschema $R_c \rightleftharpoons R_o \rightleftharpoons R_f$ mit den zusätzlichen Geschwindigkeitskonstanten $\lambda_{of} = 100.0 \text{ s}^{-1}$ und $\lambda_{fo} = 500.0 \text{ s}^{-1}$ liefert die Matrix

$$Q = \begin{pmatrix} -500 & 500 & 0 \\ 100 & -150 & 50 \\ 0 & 10 & -10 \end{pmatrix}$$

Die resultierenden Fluktuationen sind in Fig. 7b sichtbar. Von einem 'burstenden' Kanal unterscheidet sich dieses Beispiel nur durch die Beträge der Zeitkonstanten.

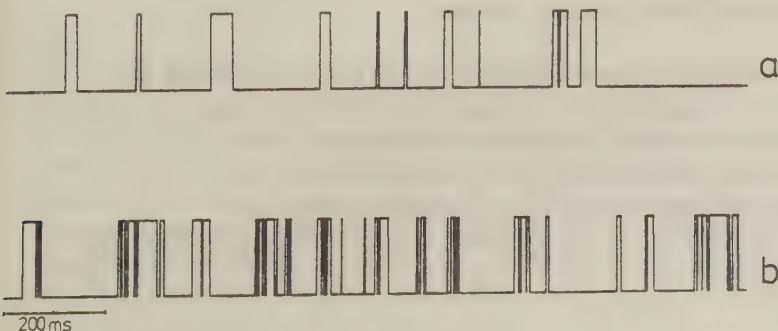
2.3.3. Statistische Analyse von Einzelkanalfluktuationen

Es wurde gezeigt, daß die Kinetik eines Ionenkanals durch die Matrix Q vollständig beschrieben wird. Deshalb ist das Ziel der statistischen Einzelkanal - Analyse, aus den gemessenen Stromfluktuationen möglichst genau diese Matrix und damit alle Reaktionskonstanten zu bestimmen. Die für diese Arbeit wichtigste Anwendung der Theorie ist somit, für diese Analyse einen Grund zu legen.

2.3.3.1. Problematik der Einzelkanalanalyse. Es ist leider in der Praxis nicht immer möglich, den gemessenen Signalen ohne weiteres eindeutig ein Reaktionsschema zuzuordnen. Einige der auftretenden Schwierigkeiten, die z.T. von Colquhoun und Hawkes (1982) schon angesprochen wurden, sind:

- Die beobachteten Stromfluktuationen stellen immer nur eine mögliche Realisierung des Markov - Prozesses dar, die statistischen Schwankungen unterliegt. Besonders für selten vorkommende Zustände kann dies zu erheblichen Verfälschungen führen, wenn die Anzahl der beobachteten Ereignisse für eine verlässliche Statistik zu klein wird.
- Oft existieren mehrere Zustände, die elektrisch nicht unterscheidbar sind (alle geschlossenen Zustände haben z.B. den Leitwert null). Es ist dann unklar, welchem Zustand ein spezielles Ereignis zuzuordnen ist.
- Es ist nicht immer gewährleistet, daß die beobachteten Stromfluktuationen auf genau einen Einzelkanal zurückgehen. Sind mehrere Kanäle beteiligt, so werden z.B. die Lebensdauern der geschlossenen Intervalle verfälscht.
- Durch die begrenzte Zeitauflösung gehen kürzere Ereignisse einfach verloren, andere werden in ihrer scheinbaren Lebensdauer verfälscht.

Fig. 7. Computer - simulierte Einzelkanalfluktuationen eines einfachen Kanals (a) und eines flickernden bzw. burstenden Kanals (b).



Besonders die begrenzte Zeitauflösung bei der Messung von Einzelkanälen kann große Schwierigkeiten machen, wenn sie mit den Geschwindigkeitskonstanten des Systems vergleichbar wird. Wie in Fig. 8a illustriert ist, wird dadurch vor allem die Statistik von Zuständen verfälscht, deren eigene Lebensdauer wesentlich länger ist. Wird zum Beispiel eine kurze Schließung des Kanals wegen ungenügender Zeitauflösung übersehen, dann erscheinen die benachbarten offenen Ereignisse fälschlicherweise als ein einziges, längerdauerndes Ereignis.

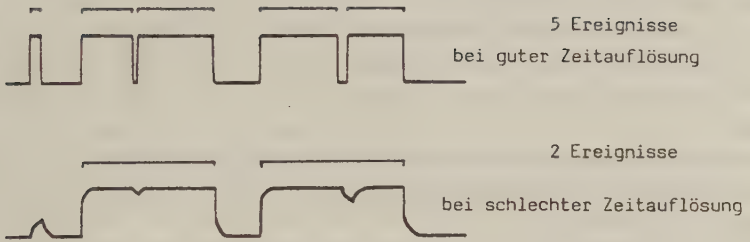
Ein verwandtes Problem ergibt sich bei dem Versuch, die Lebensdauern von Einzelkanalfluktuationen aus einer digitalisierten Meßspur zu bestimmen. Wie in Fig. 8b gezeigt wird, können gleichen Ereignissen je nach ihrer zufälligen Lage in bezug auf das Sampling - Raster unterschiedliche Lebensdauern zugeschrieben werden. Sehr kurzlebige Ereignisse können sogar dann ganz übersehen werden, wenn sie elektrisch durchaus aufgelöst wurden, mit den eben beschriebenen Folgen für die Statistik der anderen Zustände. Für hinreichend langsame Prozesse spielen diese Fehlerquellen keine Rolle, aber sie können bei schnellen Ereignissen zu beträchtlichen Abweichungen führen.

Obwohl der kontinuierliche Markov - Prozeß die korrekte mathematische Beschreibung des fluktuierenden Ionenkanals darstellt, ist er als Modell für die gemessenen Daten also ungeeignet. Durch die begrenzte Zeitauflösung der Strommessung entspricht das beobachtete Signal nicht direkt den zugrundeliegenden statistischen Fluktuationen des Einzelkanals. Eine geeignete Beschreibung der experimentell vorliegenden Meßdaten ist dagegen durch die diskrete Markov - Kette gegeben. Deshalb erscheint es sinnvoll, die Analyse der digitalisierten Meßdaten auf die Parameter der entsprechenden diskreten Kette auszurichten. Aus der Matrix P der diskreten Kette läßt sich dann bei Kenntnis der Digitalisierungs - Taktzeit die richtige Matrix Q des kontinuierlichen Prozesses bestimmen.

2.3.3.2. Das Matrix - Auswertverfahren. Der von mir vorgeschlagene Weg zur Analyse von Einzelkanalfluktuationen ist also der folgende:

- Digitalisieren der Meßsignale mit einer geeigneten Taktzeit Δt ,
- Bestimmen der Übergangsmatrix der diskreten Markov - Kette,
- Berechnen der Matrix Q des kontinuierlichen Prozesses, und
- Ansatz eines Reaktionsschemas und Ablesen der Geschwindigkeitskonstanten aus der Matrix Q .

a



vgl. Neher 1983

b

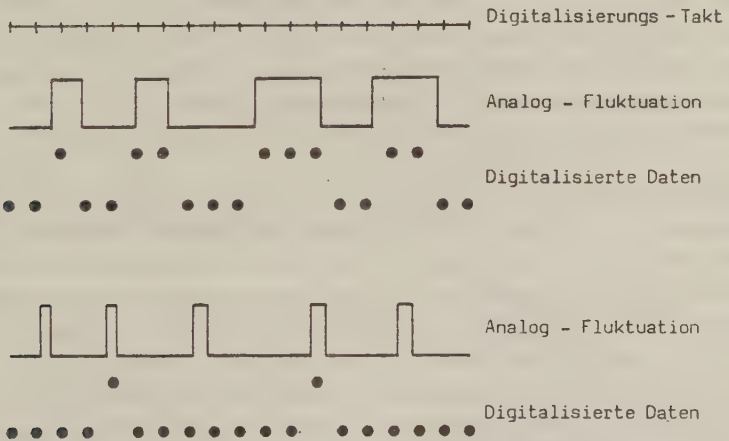


Fig. 8. Fehlerquellen bei der Lebensdauer - Analyse. a) Durch eine schlechte Zeitauflösung gehen kurze Schließungen verloren, die Anzahl und scheinbare Lebensdauer der Öffnungen wird dadurch verfälscht. b) Beim Digitalisieren können jeweils gleichlang dauernde Ereignisse als unterschiedlich lang erkannt werden (oberes Beispiel), und kurze Ereignisse werden oft ganz übersehen (unteres Beispiel).

Dieses Vorgehen bringt eine Reihe von Vorteilen mit sich.

- Es werden der Auswertung direkt ermittelte Lebensdauern und Ereigniszahlen zugrunde gelegt. Extrapolationen, Rundungen und Näherungen finden nicht statt, bevor der Übergang zum kontinuierlichen Prozeß durchgeführt wird.
- Die begrenzte Zeitauflösung der Messung geht nicht in die Auswertung ein, sofern die Taktzeit etwas langsamer als die erreichbare Zeitauflösung gewählt wurde. Die tatsächlich erreichte Zeitauflösung in einem Patch - Clamp - Experiment wird durch zufällige Parameter (Größe des Patch, Pipetteneigenschaften, Ableitbedingungen) beeinflusst, die auf diese Weise ausgeschaltet werden können.
- Die Darstellung der Meßspur als diskrete Zahlenfolge eignet sich ganz hervorragend zur maschinellen Verarbeitung mit dem Computer. Es ist in der Tat so, daß jede Computer - Analyse von Patch - Clamp - Ergebnissen zwangsläufig eine diskrete Folge von Meßwerten betrachten muß; dies wird jedoch nicht immer mit allen Konsequenzen bewußt erkannt.
- Der wichtigste Vorteil des diskreten Ansatzes der Auswertung ist, daß die in Fig. 8 illustrierten Unsicherheiten der Zeitanalyse ausgeschaltet werden. Die Tatsache, daß kurzlebige Ereignisse übersehen und dafür andere zu lang erscheinen werden, ist im Zusammenhang zwischen P und Q bereits enthalten, so daß es keiner weiteren Annahmen oder Korrekturen bedarf.

Es stellt sich also die Aufgabe, aus den experimentellen Meßdaten eine Übergangsmatrix P zu ermitteln. Dies kann mit dem Computer leicht durchgeführt werden, wenn die Zustände des Systems alle elektrisch unterschieden werden können. Dies ist zum Beispiel der Fall bei einem Ensemble von n identischen einfachen auf/zu-Kanälen mit je nur zwei Zuständen. Die Stromniveaus 0, 1, 2, ..., n, die verschiedenen Anzahlen geöffneter Kanäle entsprechen, sind elektrisch leicht zu trennen und zu jedem diskreten Zeitpunkt läßt sich eindeutig der Zustand des Systems angeben. Die Häufigkeiten der Übergänge, n_{ij} , lassen sich mit dem Computer auszählen und die Übergangsmatrix P und ihre stationäre Verteilung a können gemäß

$$(44a,b) \quad p_{ij} = \frac{n_{ij}}{\sum_k n_{ik}} \quad \text{und} \quad a_i = \frac{1}{N} \cdot \sum_j n_{ij}$$

angegeben werden. Dabei ist N die Anzahl der Datenpunkte.

Die stationäre Zustandsverteilung a kann direkt aus den Daten gemäß Gl. 44b, aber auch gemäß Gl. 35 aus der Matrix P bestimmt werden. Die Übereinstimmung dieser zwei Vektoren a ist eine Kontrolle für die Konsistenz der Daten. Große Differenzen bedeuten, daß eine der Annahmen, die über die Meßdaten

gemacht wurden, nicht stimmt. Zum Beispiel könnte es sein, daß die gemessene Fluktuation nicht stationär war, so daß eine Beschreibung durch eine homogene Markov - Kette nicht zutrifft. Es könnte auch sein, daß zusätzliche, in der Auswertung nicht berücksichtigte Zustände aufgetreten sind. Oft kommt es zum Beispiel vor, daß ein zusätzlich vorhandener Burst - Prozeß nicht auf Anhub erkannt wird.

Es soll an dieser Stelle noch einmal erwähnt werden, daß die aus dem Experiment ermittelte Matrix P statistischen Schwankungen unterliegt und deshalb nur eine Abschätzung für die tatsächliche Matrix P des Prozesses liefert. Für lange Beobachtungszeiträume und große Anzahlen von Einzelereignissen ist jedoch zu erwarten, daß diese Abschätzung hinreichend gut sein wird.

2.3.3.3. Beispiel. Das vorgeschlagene Verfahren zur Analyse von Einzelkanalfluktuationen soll nun an Hand von synthetischen Daten illustriert werden. Dazu wird von der bereits verwendeten Matrix

$$Q = \begin{pmatrix} -500. & 500. & 0. \\ 100. & -150. & 50. \\ 0. & 10. & -10. \end{pmatrix}$$

ausgegangen. Der Prozeß wird als ein burstender Kanal mit sehr kurzlebigen geschlossenem Zustand aufgefaßt und es wird versucht, die mittlere Lebensdauer des offenen Zustandes zu ermitteln. Der theoretische Wert ist

$$\tau_0 = -1/q_{22} = 1/150 \text{ s}^{-1} = 6.67 \text{ ms}.$$

Die Matrix Q besitzt die Eigenwerte -609.1, -50.9 und natürlich 0.0 mit dem linken Eigenvektor, also der stationären Zustandsverteilung,

$a_1 = a_c = 0.0323$, $a_2 = a_o = 0.1613$ und $a_3 = a_d = 0.8064$. Der Test für das Auswertverfahren ist nun, ob sich die mittlere Lebensdauer des offenen Zustandes aus den simulierten Daten auch unter erschwerten 'Meßbedingungen', also bei begrenzter Zeitauflösung, einigermaßen gut ermitteln läßt.

Für eine Taktzeit von 0.5 ms ergibt sich aus Gl. 39 die Übergangsmatrix

$$P = \begin{pmatrix} 0.784 & 0.213 & 0.003 \\ 0.043 & 0.933 & 0.024 \\ 0.0 & 0.005 & 0.995 \end{pmatrix}.$$

Mit dem Programm MCHAIN werden für diese Matrix synthetische Kanalfluktuationen dargestellt (Fig. 9a. In der Darstellung wurde die Amplitude des geschlossenen Zustandes auf 1/3 der des offenen Zustandes gesetzt,

um eine visuelle Unterscheidung vom desensitivierten Zustand zu erlauben.)). Die Übergangshäufigkeiten wurden für $N = 20000$ Datenpunkte der synthetischen Zustandsfolge ausgezählt und folgende Verteilung gefunden:

$$(n_{ij}) = \begin{pmatrix} 527 & 154 & 4 \\ 157 & 3268 & 81 \\ 0 & 84 & 15725 \end{pmatrix}$$

Aus dieser Matrix lassen sich die Parameter der 'experimentell' beobachteten Kette bestimmen. Die Anzahl beobachteter Ereignisse des Zustands R_i ist

$$(45) \quad m_i = \sum_{j \neq i} n_{ij}$$

Der geschlossene Zustand wurde also $m_c = 158$, der offene Zustand $m_o = 238$, und der desensitivierte Zustand $m_d = 85$ mal angenommen. Die aus den Daten gemäß Gl. 44b ermittelte stationäre Zustandsverteilung weicht mit $a_c = 0.035$, $a_o = 0.175$ und $a_d = 0.790$ nur geringfügig von der Theorie ab.

Die gesuchte mittlere Lebensdauer des offenen Zustandes kann nun auf zwei Arten bestimmt werden. Die erste Möglichkeit ist, die Lebensdauern gemäß Gl. 36 direkt aus der diskreten Kette durch Anpassen eines Zerfallsgesetzes an die Lebensdauerverteilung zu ermitteln. Die zu diesem Zweck erstellten Computer - Programme sind im Methoden - Teil beschrieben. Dieser Ansatz funktioniert auch dann, wenn die zwei Arten von Schließungen nicht, wie hier, getrennt werden können und liefert für die hier gezeigten Daten $\tau_o = 7.11 \text{ ms.}$

Die zweite und im Prinzip bessere Methode ist, aus den gezählten Übergangshäufigkeiten die Übergangsmatrix P zu bestimmen und daraus über die Rücktransformation Gl. 40 die Matrix Q zu berechnen. Die 'experimentellen' Matrixelemente von P sind durch Gl. 44a gegeben. Das Ergebnis ist

$$P = \begin{pmatrix} 0.769 & 0.225 & 0.006 \\ 0.045 & 0.932 & 0.023 \\ 0.0 & 0.005 & 0.995 \end{pmatrix}$$

und

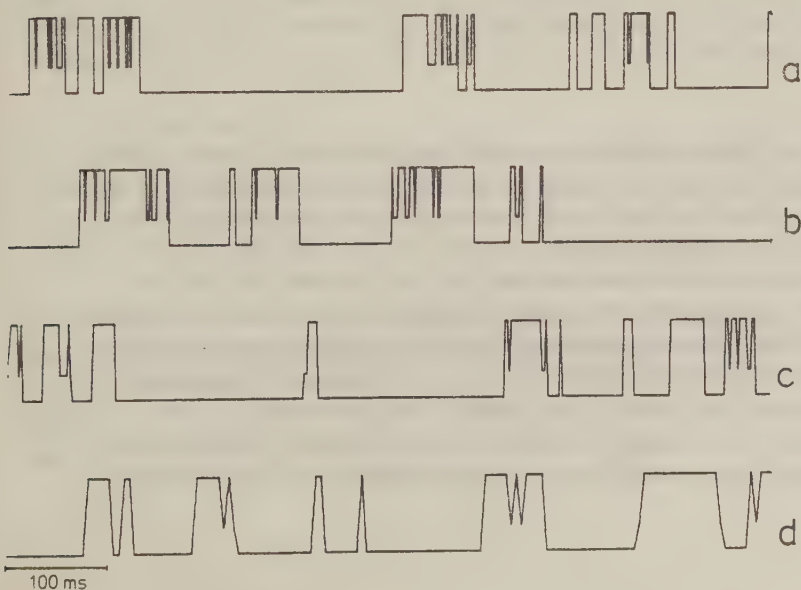
$$Q = \begin{pmatrix} -540.5 & 533.2 & 7.2 \\ 106.7 & -154.3 & 47.6 \\ -0.3 & 10.4 & -10.1 \end{pmatrix}$$

mit $\tau_o = 1/154.3 \text{ s}^{-1} = 6.48 \text{ ms.}$ In beiden Fällen ergibt sich also eine in Hinblick auf die statistische Natur der Fluktuationen hinnehmbare Approximation für τ_o , weil die kurze Taktzeit eine hinreichende Auflösung auch

der kurzen Schließungen erlaubt. Bei der Matrix - Auswertung werden jedoch zugleich Geschwindigkeitskonstanten für alle Übergänge des Systems ermittelt. Da aber eine spezielle statistische Fluktuation ausgewertet wurde, sind die gewonnenen Werte natürlich nur Approximationen, die mit zufälligen Meßfehlern behaftet sind. So kann es auch vorkommen, daß die aus dem Experiment ermittelte Matrix Q negative nichtdiagonale Einträge enthält, wie hier das Element q_{31} . Wichtig ist vor allem, daß die im Reaktionschema vorkommenden Geschwindigkeitskonstanten relativ gut angenähert werden. Voraussetzung für den Erfolg der Matrix - Auswertung ist, daß die analysierte Fluktuation den Bedingungen der Stationarität genügt. Dies kann wiederum durch die Lebensdauerverteilung der Zustände kontrolliert werden, die nur in diesem Fall einem exponentiellen Zerfallsgesetz genügt.

Interessant ist, was passiert wenn die Taktzeit länger gewählt wird. Für denselben Prozeß werden deshalb auf die gleiche Weise synthetische Fluktuationen mit Taktzeiten von 1, 2 und 5 ms erzeugt (Fig. 9b, c, und d). Die Auflösung der geschlossenen Zustände wird dabei schlechter und verschwindet fast völlig. Wie in Fig. 8a skizziert wurde, hat dies einen großen Effekt auf die scheinbaren Lebensdauern des offenen Zustandes, der jedoch durch die Matrix - Auswertung weitgehend ausgeschaltet werden sollte.

Fig. 9. Synthetische Fluktuationen eines burstenden Kanals bei unterschiedlicher Taktzeit (s. Text).



In Tabelle 2 sind die gemäß Gl. 36 direkt und die über das Matrix - Verfahren ermittelten τ_0 - Werte einander gegenübergestellt. Besonders bei den längeren Taktzeiten wird deutlich, daß die direkt bestimmten Lebensdauern viel zu lang sind, während die mit der Matrix bestimmten Werte eine wesentlich bessere Approximation geben. Bemerkenswert ist, daß selbst bei $\Delta t = 5$ ms die 'experimentell' ermittelte Matrix

$$Q = \begin{pmatrix} -436.9 & 429.3 & 7.7 \\ 89.7 & -135.9 & 46.4 \\ 0.2 & 9.1 & -9.3 \end{pmatrix}$$

die Geschwindigkeitskonstanten des Reaktionsschemas mit nur etwa 15 % Fehler approximiert, obwohl die geschlossenen Zustände, wie erwähnt, fast nicht mehr aufgelöst werden. Dies illustriert, wie die in den relativen Häufigkeiten der Übergänge 'versteckte' Information über das System durch das Matrix - Verfahren der Auswertung zu Tage gebracht werden kann.

Tabelle 2. Gegenüberstellung der Verfahren zur Auswertung an Hand des im Text beschriebenen Beispiels.

Taktzeit, ms	τ_0 direkt	τ_0 über Matrix
0.5	7.11 ms	6.48 ms
1.0	8.08 ms	6.49 ms
2.0	9.42 ms	7.07 ms
5.0	12.0 ms	7.36 ms

Theoretischer Wert: 6.67 ms

2.3.3.4. Eingeschränktes Auswertverfahren. Die Bestimmung von P aus den Meßdaten wird schwierig, wenn mehrere Zustände elektrisch nicht getrennt werden können. Dies kommt in der Praxis häufig vor, z.B. bei Vorliegen mehrerer geschlossener Zustände, und war auch in dieser Arbeit der Regelfall. Ein direktes Auszählen der Übergänge ist dann nicht möglich, weil die einzelnen Ereignisse nicht eindeutig einem Zustand des Systems zugeordnet werden können. Es ist dann erforderlich, die Übergangsraten indirekt aus anderen Parametern der Markov - Kette zu erschließen. Die Lebensdauer - Verteilungen sind, wenn mehrere Zustände einem gemeinsamen Leitwert entsprechen, keine einfachen Exponentialfunktionen, sondern kompliziertere Ausdrücke (meist Summen mehrerer Exponentialterme). Aus ihnen können für

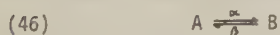
einfache Reaktionsschemata wenigstens die Diagonalelemente von P bestimmt werden, also die Zustandslebensdauern. Oft ist es besser, auf die vollständige Bestimmung von P zu verzichten und einzelne Reaktionsschritte gesondert zu betrachten. In der Praxis hilft es in komplizierten Fällen, das Reaktionsschema durch willkürliche Einschränkungen zu vereinfachen. Zum Beispiel kann eine Mindestdauer für Schließungen vereinbart werden, um einen schnellen Flicker - Prozeß zu eliminieren. Desgleichen können alle eine Maximaldauer überschreitenden Schließungen als desensitivierte Zustände unberücksichtigt bleiben. Die angestrebte Wirkung solcher Einschränkungen ist, das Reaktionsschema, wie in Abschnitt 2.2.2. beschrieben, zu vereinfachen. Da die betroffenen Zustände aber nicht, wie dort vorausgesetzt, sicher identifiziert werden können und stattdessen ein willkürliches Kriterium festgesetzt wurde, treten an dieser Stelle Fehler auf. Diese sind vernachlässigbar, wenn die Trennung der Zustände gut ist, ihre Lebensdauern also sehr verschieden sind. Wenn die Lebensdauern der betroffenen Zustände dagegen weniger als eine Größenordnung auseinanderliegen, werden diese Fehler sehr groß. Eine Klassifizierung der Zustände durch eine willkürlich festgesetzte Zeitschranke ist dann nicht mehr vertretbar.

2.4. Reaktionskinetik und Kanalmodelle

Wie in den letzten Abschnitten dargestellt wurde, läßt sich das Reaktionsschema des Ionenkanals in der Matrix Q zusammenfassen, und das Einzelkanal - Verhalten wird durch diese Matrix festgelegt. Die nächste Frage ist, welche Reaktionsmodelle für einen Ionenkanal in Frage kommen und welche molekularen Prozesse sie widerspiegeln.

2.4.1. Einfacher Kanal

Der einfachste denkbare Fall einer chemischen Reaktion ist der, daß ein Molekül, wie zum Beispiel ein Kanalprotein, zwischen zwei möglichen Zuständen wechseln kann. Das Reaktionsschema lautet dann



Dabei bezeichnen A, B die chemischen Spezies, also die Kanalzustände, und α , β die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion. Für die Konzentrationen der Reaktionspartner A und B gilt das Massenwirkungsgesetz

$$(47) \quad \frac{dA}{dt} = -\alpha \cdot A + \beta \cdot B = -\frac{dB}{dt}$$

Unabhängig von der Wahl der Anfangskonzentrationen erreicht die Reaktion im Laufe der Zeit ein Gleichgewicht, bei dem die Konzentrationen sich zeitlich nicht weiter verändern. Aus der Gleichgewichtsbedingung

$$(48a,b) \quad \frac{dA}{dt} = 0 \quad \text{oder} \quad \alpha A = \beta B$$

wird die Gleichgewichtskonstante

$$(49) \quad K = \frac{A}{B} = \frac{\beta}{\alpha}$$

bestimmt. Sie gibt die Gleichgewichtsverteilung des gesamten vorhandenen Kanalproteins auf die zwei Zustände A und B an.

Die beiden Zustände unterscheiden sich im allgemeinen in ihrem Energieinhalt, und der Übergang zwischen den Zuständen erfordert eine Aktivierungsenergie E_α bzw. E_β , die durch thermische Schwankungen erbracht werden kann. Die Geschwindigkeitskonstanten α und β sind deshalb temperaturabhängig gemäß der Arrhenius - Gleichung (Alberty und Daniels 1979)

$$(50a,b) \quad \alpha \sim \exp(-E_\alpha / RT) \quad \text{und} \quad \beta \sim \exp(-E_\beta / RT)$$

Dabei ist R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Im allgemeinen ist folglich auch die Gleichgewichtskonstante temperaturabhängig:

$$(51) \quad K = \frac{\beta}{\alpha} = C \exp((E_\alpha - E_\beta) / RT) = C \exp(\Delta H_0 / RT)$$

ΔH_0 ist die Differenz der Enthalpien (Reaktionsenthalpie) der beiden Zustände des Moleküls. Die Differenz der freien Enthalpien $\Delta G_0 = \Delta H_0 - T \Delta S_0$ bestimmt die Gleichgewichtsverteilung, während die Reaktionsraten und damit die Geschwindigkeit, mit der das Gleichgewicht erreicht wird, von der Höhe der Aktivierungsenergien E_α , E_β abhängen. Diese Unterscheidung ist für Einzelkanäle besonders wichtig. Die mittlere Öffnungswahrscheinlichkeit oder, allgemeiner, die stationäre Zustandsverteilung wird allein durch den Energiegehalt der Zustände bestimmt. Die Zustandslebensdauern hängen dagegen von der Höhe der Energiebarriere ab, die bei der Konformationsänderung des Kanals überwunden werden muß.

Nun sei A der geschlossene und B der offene Zustand des Kanals. Die mittlere Öffnungswahrscheinlichkeit ist durch die Gleichgewichtskonstante gegeben

$$(52a,b) \quad p_0 = \frac{K}{1 + K} \quad \text{oder} \quad K = \frac{p_0}{1 - p_0}$$

Die Lebensdauern der einzelnen Ereignisse im offenen und geschlossenen

Zustand sind exponentiell verteilt. Die mittleren Lebensdauern werden durch die jeweilige Übergangsrate in den anderen Zustand bestimmt:

$$(53a,b) \quad \tau_o = 1/\beta \quad \text{und} \quad \tau_c = 1/\alpha$$

Aus Gl. 51 - 53 folgt die Beziehung

$$(54) \quad p_o = \frac{\tau_o}{\tau_o + \tau_c}$$

Dies ist, für diesen einfachsten Fall, die spezielle Form des auf Seite 34 erörterten Zusammenhangs zwischen den Übergangsraten und der stationären Zustandsverteilung des Einzelkanals. Die Matrix Q für dieses Reaktionsschema ist übrigens ganz einfach

$$(55) \quad Q = \begin{pmatrix} -\alpha & \alpha \\ \beta & -\beta \end{pmatrix}$$

2.4.2. Spannungsabhängiger Kanal

Ein Ionenkanal ist spannungsabhängig, wenn die freien Enthalpien der Kanalzustände vom Membranpotential beeinflusst werden. Es ist zum Beispiel denkbar, daß die Konformationsänderung des Proteins mit einer Verschiebung von geladenen Gruppen im elektrischen Feld der Membran verbunden ist. Die Gleichgewichtskonstante wird dann eine Funktion der Spannung:

$$(56) \quad K = \exp\left(\frac{\Delta G_o + zFV}{RT}\right)$$

Dabei ist zFV der durch das elektrische Feld bewirkte Anteil der Energiedifferenz, formal dargestellt als Produkt von Membranspannung V und Ladung zF. (F ist die Faraday - Konstante.) Die formale Ladung zF wird oft als 'gating charge' bezeichnet. Sie kann aus der Steigung der logarithmisch gegen die Spannung V aufgetragenen Gleichgewichtskonstanten experimentell bestimmt werden:

$$(57) \quad RT \cdot \ln(K) = \Delta G_o + zFV$$

Es ist oft bequem, die Differenz der freien Enthalpien ΔG_o durch eine 'Gleichgewichtsspannung' V_o auszudrücken gemäß

$$(58a,b) \quad \Delta G_o + zFV = zF(V - V_o) \quad \text{mit} \quad V_o = -\Delta G_o/zF$$

Dann ist V_o die Spannung, bei welcher die vorhandene Substanzmenge auf beide Zustände gleich verteilt ist, oder, für Einzelkanäle, der Kanal 50 % der Zeit offen ist ($K = 1$).

Die formale Ladung zF suggeriert, daß bei der Konformationsänderung eines Proteinmoleküls jeweils z Elementarladungen durch die Potentialdifferenz V , also durch die Membran, bewegt werden. Die gleiche Energiedifferenz kann aber auch auf andere Weise zustande kommen, zum Beispiel durch nur teilweises Verschieben einer entsprechend größeren Ladung oder durch eine Drehung von elektrischen Dipolen innerhalb der Membran, wie sie bei Alamethicin auftritt (Boheim et al. 1983). Der Begriff 'gating charge' bezeichnet also eine rein formale Größe, deren physikalische Bedeutung im Einzelfall zu klären ist.

In der Matrix - Darstellung des Reaktionsschemas sind diejenigen Matrixelemente, welche die spannungsabhängigen Reaktionsschritte beschreiben, Funktionen der Spannung. Dabei stellt sich die Frage, wie sich die Spannungsabhängigkeit einer Teilreaktion auf die beiden Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion verteilt. Diese hängen mit der Höhe der Aktivierungsenergien zusammen (Fig. 10), und wie diese sich bei einer Änderung der Spannung verhalten. Es liegt ein einfacher linearer Ansatz nahe

$$(59a,b) \quad E_{\alpha}(V) = E_{\alpha 0} - \epsilon \cdot zFV \quad \text{und} \quad E_{\beta}(V) = E_{\beta 0} - (\epsilon - 1) zFV$$

Der Parameter ϵ wird anschaulich als die 'Lage der Energie - Barriere' gedeutet, die die formale Ladung zF im konstanten Feld der Membran überwinden muß (Fig. 10). Wie der Begriff der 'gating charge' selbst ist dies natürlich eine rein formale Zuordnung, zumal über den genauen Verlauf des elektrischen Feldes im Bereich der von Proteinen durchsetzten Membran praktisch nichts bekannt ist. Experimentell läßt sich ϵ aus der Spannungsabhängigkeit der Zustandslebensdauern bestimmen. Im einfachsten Fall unter symmetrischen Bedingungen ist $\epsilon = 1/2$ zu erwarten. Eine nur in der einen Richtung spannungsabhängige Reaktion ($\epsilon = 0$ oder $\epsilon = 1$) könnte zum Beispiel vorliegen, wenn die Gating - Charge auf einer Membranseite ein Ion aus der Lösung bindet, welches auf der anderen Membranseite wieder abgegeben wird.

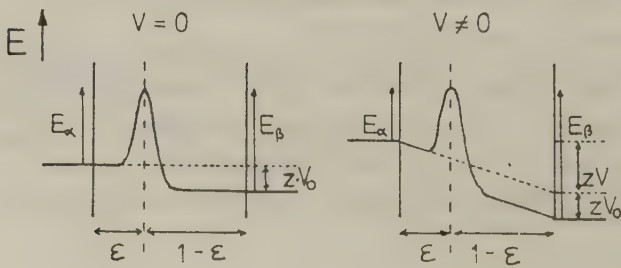


Fig. 10.
Illustration
zur Energie-
Barriere des
spannungsab-
hängigen
Kanals

2.4.3. Agonisten - abhängiger Kanal

Bei Agonisten - aktivierten Ionenkanälen wird die Konformationsänderung in den geöffneten Zustand durch eine chemische Substanz, den Agonisten, ausgelöst. Agonisten können synaptische Transmittersubstanzen, aber auch spezifische Ionen (wie zum Beispiel Ca^{++}) sein. Chemisch bedeutet dies, daß das Kanalprotein ein oder mehrere Moleküle des Agonisten binden muß, bevor der offene Zustand angenommen werden kann (Katz und Miledi 1972). Das einfachste derartige Reaktionsschema ist



mit der Matrix

$$(61) \quad Q = \begin{pmatrix} -[A]k_1 & [A]k_1 & 0 \\ k_2 & -(k_2 + \alpha) & \alpha \\ 0 & \beta & -\beta \end{pmatrix}$$

Dabei ist A der Agonist und $M = k_1/k_2$ die Gleichgewichtskonstante der Bindungsreaktion. Wenn die Bindungs- und Dissoziationsreaktion sehr viel schneller als die Konformationsänderung erfolgt, nehmen die geschlossenen Zustände R und AR wie im Abschnitt 2.2.2. beschrieben ihre stationäre Verteilung an und das Reaktionsschema kann ersetzt werden durch



Die Anzahl der zu berücksichtigenden Zustände verringert sich also, dafür treten in den einzelnen Matrixelementen kompliziertere Abhängigkeiten von der Agonistenkonzentration auf. Die Matrix Q reduziert sich dabei auf

$$(63) \quad Q = \begin{pmatrix} -\lambda_{co} & \lambda_{co} \\ \lambda_{oc} & -\lambda_{oc} \end{pmatrix}$$

mit

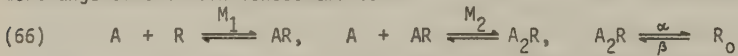
$$(64a,b) \quad \lambda_{co} = \alpha \cdot (1 + M/[A])^{-1} \quad \text{und} \quad \lambda_{oc} = \beta.$$

Die mittlere Verweildauer im geschlossenen Zustand $\tau_c = 1/\lambda_{co}$ ist also eine Funktion der Agonistenkonzentration. Ist diese klein im Vergleich zur Bindungskonstante M, so kann die Lebensdauer mit

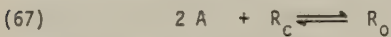
$$(65) \quad \tau_c = \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{M}{[A]}$$

angenähert werden. Die Lebensdauer der offenen Zustände $\tau_o = 1/\lambda_{oc}$ ist dagegen von der Agonistenkonzentration unabhängig.

Experimentelle Untersuchungen an einzelnen Ionenkanälen zeigen, daß dieses einfache Reaktionsschema viele Agonisten - abhängige Ionenkanäle nicht ausreichend beschreibt. Das Verhalten der Kanäle ist in der Regel wesentlich komplizierter, mit einer größeren Anzahl von möglichen Zuständen und eventuell der Notwendigkeit, vor dem Öffnen des Kanals mehrere Agonistenmoleküle zu binden. In vielen Fällen, wie zum Beispiel dem Acetylcholin - Rezeptorkanal (Adams 1981) oder den Glycin- und Glutamatrezeptoren spinaler Neuronen (Sakmann et al. 1983) sind offenbar zwei Agonistenmoleküle für das Öffnen eines Ionenkanals erforderlich. Dem Verhalten der Öffnungswahrscheinlichkeit p_o zufolge ist dies auch für den Ca^{++} - abhängigen K^+ - Kanal aus den transversalen Tubuli des Kaninchenmuskels der Fall (Latorre et al. 1982). Das dort angenommene Reaktionsschema ist



Zur Vereinfachung des Schemas werden die drei Zustände R , AR und A_2R , die sich nur durch die Anzahl gebundener Agonistenmoleküle unterscheiden, zu einem einzigen geschlossenen Zustand R_c zusammengefaßt. Dies ist wieder erlaubt unter der Annahme, daß die Bindungsreaktionen gegenüber der Konformationsänderung des Kanalproteins sehr rasch verlaufen. Das vereinfachte Reaktionsschema lautet



Die Geschwindigkeitskonstante für das Öffnen des Kanals ist von der Agonistenkonzentration abhängig gemäß

$$(68) \quad \lambda_{co} = \alpha \cdot \left(1 + \frac{M_1}{[A]} + \frac{M_1 M_2}{[A]^2} \right)^{-1}$$

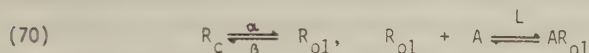
und die Rate der Rückreaktion ist dagegen wieder von der Agonistenkonzentration unabhängig. Für kleine Agonistenkonzentrationen ist die mittlere Lebensdauer des beobachtbaren geschlossenen Zustands R_c

$$(69) \quad \tau_c = \frac{M_1 M_2}{\alpha \cdot [A]^2}$$

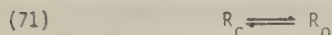
2.4.4. Blockade - Reaktion

Obwohl die einfachen Aktivierungsschemata eine von der Agonistenkonzentration unabhängige Öffnungsdauer fordern, zeigen die Einzelkanal - Meßspuren des Ca^{++} - abhängigen K^+ - Kanals in Fig. 24 - 27 deutlich daß die mittlere Lebensdauer des offenen Zustandes mit steigender Calciumkonzentration auf der Innenseite der Membran dramatisch zunimmt. Dieses Verhalten ist dann verständlich, wenn der offene Kanal Calcium binden und dadurch am

Schließen gehindert werden kann. Ein mögliches Reaktionsschema für diesen Schritt ist



Wieder läßt sich das Reaktionsschema bei Annahme einer schnellen Bindungsreaktion durch Zusammenlegen der Zustände R_{O1} und AR_{O1} zu R_O reduzieren auf



Die Geschwindigkeitskonstanten sind dann

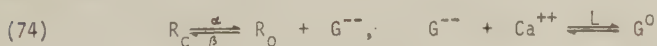
$$(72a,b) \quad \lambda_{CO} = \alpha \quad \text{und} \quad \lambda_{OC} = \beta \cdot (1 + \frac{[A]}{L})^{-1}$$

2.4.5. Calcium - sensibles Gatter

Ein wichtiger experimenteller Befund am Ca^{++} -abhängigen K^+ -Kanal ist, daß die Spannungs- und Agonistenabhängigkeiten durch die Äquivalenzrelation

$$(73) \quad \Delta V = \frac{RT}{F} \Delta \ln([Ca^{++}]_i)$$

verknüpft sind. Dies bedeutet, daß eine Spannungsänderung ΔV denselben Effekt auf die Lebensdauern der offenen und geschlossenen Zustände hat wie eine gemäß Gl. 73 entsprechende Änderung der Calciumkonzentration. Diese Äquivalenz von Ca^{++} und Spannung ist überraschend, wenn für ihre Wirkung getrennte Mechanismen postuliert werden. Naheliegender ist, daß Ca^{++} und die Spannung an einer gemeinsamen Kanalstruktur angreifen, die das Schalten des Kanals bestimmt. Deshalb wurde für diese Kanäle die Vorstellung eines geladenen Gatters (engl. 'gate') eingeführt (Methfessel und Boheim 1982). Das Gatter ist eine bewegliche Struktur, welche den Kanal in seinem geschlossenen Zustand blockiert. Beim Öffnen des Kanals muß die Ladung des Gatters durch das elektrische Membranpotential bewegt werden, so daß diese Reaktion spannungsabhängig ist. Durch Binden von Calcium wird das Gatter neutralisiert und kann den Kanal nicht wieder verschließen, bevor das Calciumion abdissoziiert ist. Das Reaktionsschema für diesen Schritt ist



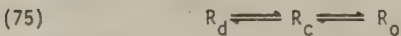
Wieder wird die Annahme einer schnellen Bindungsreaktion gemacht. In der Gegenwart von Calcium ist dann die Reaktionsbereitschaft des Gatters vermindert und damit die Lebensdauer des offenen Zustands erhöht. Die davon resultierenden Geschwindigkeitskonstanten des Öffnens und Schliessens des

Kanals sind genau wie in Gl. 72. Der Vorteil des Gatter - Konzeptes ist aber, daß die Äquivalenz von Spannung und Agonistenkonzentration berücksichtigt ist. Eine positive Spannung und eine erhöhte Calciumkonzentration verschieben beide das Gleichgewicht auf die Seite des offenen Kanals.

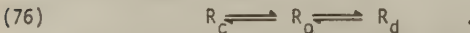
2.4.6. Kinetik der Bursts

In dieser Arbeit wurde die Statistik der Bursts und Clusters sowie der dazwischenliegenden langen, desensitivierten Intervalle nicht quantitativ ausgewertet. Diese Prozesse sind sehr langsam, so daß für eine verlässliche Statistik sehr lange Meßzeiten nötig gewesen wären. Auf die Kinetik der Bursts wird hier also nur kurz eingegangen.

Bei der Darstellung des Reaktionsschemas für einen burstenden Kanal durch seine Matrix Q gibt es keine prinzipiellen Einschränkungen, welche Übergänge im einzelnen erlaubt sind. Für diesen allgemeinen Fall ist die Statistik der Lebensdauern der Bursts und der Intervalle dazwischen, der Anzahl von Ereignissen in einem Burst, usw. von Colquhoun und Hawkes (1982) ausführlich diskutiert worden. Es treten dabei etwas kompliziertere Ausdrücke mit mehreren Zeitkonstanten auf. Bei Annahme eines linearen Reaktionsschemas stellt sich die etwas einfachere Frage, ob ein aktiver Burst aus dem geschlossenen oder dem offenen Zustand verlassen wird. Im ersten Fall lautet das Reaktionsschema



und im zweiten Fall



Zwischen diesen beiden Fällen kann experimentell leicht unterschieden werden, wenn die Öffnungswahrscheinlichkeit p_o innerhalb des Bursts durch einen Parameter beeinflusst wird. Es ergibt sich dann eine unterschiedliche Wirkung des Parameters auf die Burst - Lebensdauer. Im ersten Fall ist die Lebensdauer der Bursts

$$(77) \quad \tau_b = \frac{1}{\lambda_{cd}} \cdot \frac{1}{(1 - p_o)} = \frac{1}{\lambda_{cd}} \cdot (1 + K) ,$$

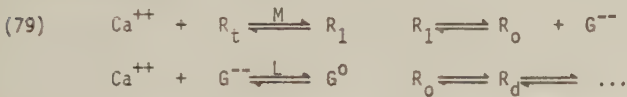
und nimmt mit größer werdendem p_o zu, weil die mittlere Verweildauer im geschlossenen Zustand pro Burst konstant bleiben muß. Im zweiten Fall ist die Burst - Lebensdauer durch

$$(78) \quad \tau_b = \frac{1}{\lambda_{od}} \cdot \frac{1}{p_o} = \frac{1}{\lambda_{od}} \cdot (1 + 1/K)$$

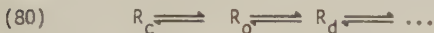
gegeben, wobei die Gesamt - Verweilzeit im offenen Zustand pro Burst konstant bleibt. Der zweite Fall wurde von Neher und Steinbach (1978) für die Blockade von Acetylcholin - Rezeptorkanälen durch das Lokalanaesthetikum QX 222 gefunden und ist typisch für Kanalblockaden, wenn der Blocker ein Schließen des Kanals verhindert. Ein zweites Beispiel ist die TEA- Blockade des hier untersuchten Kanals. Beim Calcium - abhängigen Kalium - Kanal nimmt die Lebensdauer der Bursts mit zunehmendem P_o deutlich ab, was für das zweite Reaktionsschema spricht. Die Gesamt - Öffnungsdauer in einem Burst scheint aber ebenfalls abzunehmen, so daß möglicherweise eine zusätzliche Spannungs- oder Calcium- Abhängigkeit des Burst - Prozesses beteiligt ist. Das würde bedeuten, daß die Geschwindigkeitskonstante λ_{od} selbst von der Spannung oder von der Ca^{++} - Konzentration abhängt.

2.4.7. Aktivierungs - Blockade - Modell

Aus den bisher betrachteten Reaktionsschritten wird nun ein Reaktionsschema für den Calcium - abhängigen Kalium - Kanal zusammengestellt (Methfessel und Boheim 1982). Es lautet



Es wird also angenommen, daß der Kanal in einer Aktivierungsreaktion ein Calciumion bindet. In der eigentlichen Öffnungsreaktion wird der Kanal durch ein geladenes Gatter freigegeben, welches selbst Calcium binden und dadurch dem Kanal entzogen werden kann. Daneben sind Übergänge zum desensitivierten und ggf. zu weiteren inaktiven Zuständen möglich. Es wird abermals angenommen, daß die Bindungsreaktionen sehr schnell ablaufen. Dadurch vereinfacht sich das Reaktionsschema zu



mit den Calcium - abhängigen Geschwindigkeitskonstanten

$$(81) \quad \lambda_{co} = \lambda_{10} \left(1 + \frac{M}{[Ca^{++}]} \right)^{-1} \quad \text{und}$$

$$(82) \quad \lambda_{oc} = \lambda_{01} \left(1 + \frac{[Ca^{++}]}{L} \right)^{-1}$$

Es wird weiter angenommen, daß die Affinität der aktivierenden Bindungsstelle für Calcium relativ gering ($M \geq 10^{-3}$ M), die Calcium - Affinität der Bindungsstelle am Gatter dagegen hoch ($L \leq 10^{-7}$ M) ist. Dann lassen sich für physiologisch relevante Calciumkonzentrationen die mittleren Lebensdauern der

beobachteten Zustände annähern durch

$$(83a,b) \quad \tau_c = \frac{1}{\lambda_{10}} \frac{M}{[Ca^{++}]} \quad \text{und} \quad \tau_o = \frac{1}{\lambda_{01}} \frac{[Ca^{++}]}{L}$$

Die Gleichgewichtskonstante K dieser Reaktion ist also quadratisch von der Calciumkonzentration abhängig, genau wie beim einfachen Aktivierungsschema mit zwei Bindungsstellen. Lediglich bei besonders hohen oder besonders geringen Calciumkonzentrationen jenseits der Bindungskonstanten einer der Bindungsstellen wäre für K eine lineare Abhängigkeit von $[Ca^{++}]$ zu erwarten.

3. Experimentelle Methoden

3.1 Die Patch - Clamp - Methode

3.1.1. Prinzip

Bei elektrophysiologischen Untersuchungen wird die erreichbare Stromauflösung durch das Eigenrauschen der Meßanordnung begrenzt, zu welchem das Widerstandsrauschen der Zelle und der Elektroden, das Eingangsrauschen des Verstärkers und andere Rauschquellen beitragen (Neher 1974). In klassischen Voltage - Clamp - Versuchen kommt der größte Beitrag vom Temperaturrauschen des Membranwiderstandes, dessen mittlere quadratische Amplitude durch den Ausdruck (Bittell und Storm 1971)

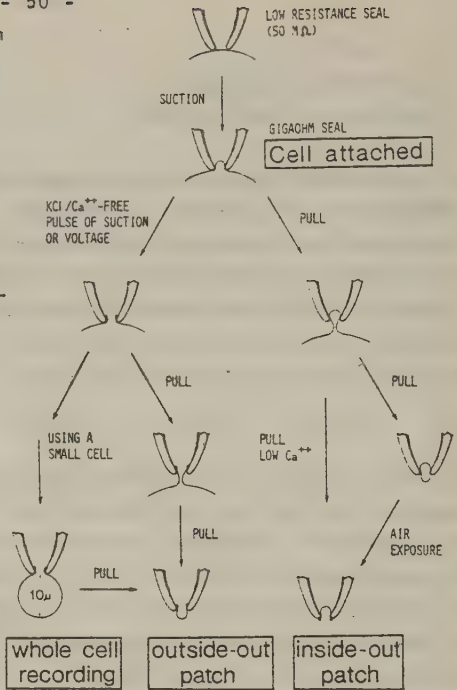
$$(84) \quad \overline{I^2(t)} = \frac{4kT}{R} \Delta f = \frac{4kT}{\varrho_m} \Delta f \cdot A$$

gegeben ist. Dabei ist Δf die Bandbreite des Verstärkers, ϱ_m der spezifische Widerstand der Membran, A die Membranfläche, R der Membranwiderstand und k die Boltzmann - Konstante. Ein weiterer Beitrag entsteht durch das Umladen der Membrankapazität durch das Eingangs - Spannungsrauschen des Verstärkers. Auch dieser Term ist der Membranfläche proportional. Im allgemeinen ist die Amplitude des Stromrauschens wesentlich größer als der Strom durch einzelne Ionenkanäle. Sie kann aber prinzipiell durch eine Verringerung der Membranfläche gesenkt werden.

Auf diesem Weg gelang es Neher und Sakmann (1976), unter Verwendung spezieller Glas - Mikropipetten die effektive Membranfläche so zu verringern, daß die Stromfluktuationen einzelner Acetylcholin - Rezeptor - Kanäle aufgelöst werden konnten. In diesen Versuchen war der Abdichtwiderstand zwischen Membran und Glaspipette für das Stromrauschen bestimmend. Später wurde entdeckt, daß die Zellmembran unter geeigneten Bedingungen mit der Glasoberfläche der Pipette eine mechanisch feste und elektrisch sehr gut isolierende Verbindung eingehen kann: das Gigaseal (Hamill et al. 1981). Die dabei erreichten Abdichtwiderstände können nur geschätzt werden (einige 10 G Ω), und das Stromrauschen wird durch den Widerstand des isolierten Membranfleckens ('patch') bestimmt, der in der Regel einige G Ω beträgt. Das Rauschen ist insgesamt aber so gering, daß auch Beiträge durch die Pipette und den Meßverstärker signifikant werden. Die hohe mechanische Festigkeit des Gigaseals erlaubt Manipulationen, die eine Reihe von unterschiedlichen Ableitkonfigurationen ermöglichen (Fig. 11). Dadurch wird die Methode äußerst vielseitig anwendbar. Zum Beispiel können wahlweise die Innen- oder Außenseiten der Membran einem Lösungswechsel zugänglich gemacht werden.

Fig. 11. Ableitkonfigurationen der Patch - Clamp - Technik (aus Hamill et al. 1981).

Nach Aufsetzen der Pipette auf die Zelloberfläche lassen sich bei einem Abdichtwiderstand von etwa 50 M Ω Einzelkanäle beobachten. Durch leichtes Ansaugen bildet sich das Gigaseal mit hohem Abdichtwiderstand, und Einzelkanäle können mit hoher Auflösung an der intakten Zelle gemessen werden (Cell - attached - Patch). Die gezeigten Manipulationen führen dann zu verschiedenen Ableitkonfigurationen. Beim Zurückziehen der Pipette von der Zelloberfläche schnürt sich die Membran ein und bildet an der Spitze der Pipette einen dichten Membranvesikel, der leicht geöffnet werden kann. Der resultierende Inside - Out - Patch erlaubt direkten Zugang zur Innenseite der Patch - Membran. Beim Outside - Out - Patch ist dagegen die Außenseite der Membran der Badlösung zugekehrt und die Innenseite ist einem Lösungswechsel nicht zugänglich. Das Gigaseal erlaubt auch einen elektrisch optimalen Zugang zum Zellinneren für Messungen an der ganzen Zelle (Whole - Cell - Recording).



3.1.2. Der Patch - Clamp Meßplatz

Zur Durchführung von Patch - Clamp - Untersuchungen wurde von mir in enger Anlehnung an die von Hamill et al. (1981) in Göttingen benutzten Einrichtungen ein Meßplatz aufgebaut. Die Apparatur umfaßt ein Mikroskop mit Arbeitsbühne, bewegliche Halterungen für den Verstärker und die Pipette und elektrische Geräte zur Aufnahme von Stromsignalen.

3.1.2.1. Mikroskop. Das Mikroskop des Patch - Clamp - Standes ist ein Invertmikroskop (Fa. Zeiss, Invertoskop D) mit Differential - Interferenzkontrast - Optik nach Nomarski (1968). Das DIK- Verfahren macht Unterschiede in der Brechzahl sichtbar und erzeugt eine reliefartige Darstellung der Zellen, die den genauen Verlauf der Zelloberfläche gut erkennen läßt. Dies ist bei Patch - Clamp - Versuchen hilfreich, weil die Pipettenspitze die Zellmembran berühren, aber nicht durchstoßen soll. Ein Invertmikroskop wurde gewählt, weil dieses einen relativ großen Arbeitsraum über dem Präparat erlaubt. Zur optimalen Ausleuchtung des Sehfeldes und Ausbildung des DIK-Effektes sollte der Kondensor etwa 1 cm über dem Präparat stehen. Wenn

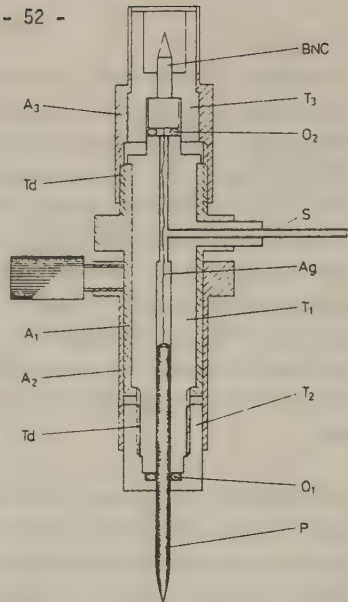
jedoch ein größerer Freiraum benötigt wird (z.B. zum steilen Aufsetzen einer Pipette) kann auch mit höher gestelltem Kondensor ein befriedigendes Bild erzielt werden. Das Mikroskop besitzt einen Binokulartubus 0,8x und Okulare 16x. Zwei spezielle DIK- Objektive mit 6,3x und 16x sind vorhanden. Bei der geringeren Vergrößerung werden die Zellen gesucht und die Pipette ins Sehfeld gebracht, während die stärkere Vergrößerung (etwa 205x) ein genaues Aufsetzen der Pipette erlaubt. Laut Herstellerangabe sind die Objektive so ausgelegt, daß für optimale Darstellung ein 0,17 mm dickes Deckglas zwischen Objektiv und Präparat liegen sollte. Da die Zellen in Plastikschälchen mit wesentlich dickerem Boden (und variablen Polarisations-eigenschaften!) kultiviert wurden, kam der DIK- Effekt nicht immer gleich gut zustande.

3.1.2.2. Mechanischer Aufbau. Der Patch - Clamp - Stand muß erschütterungsfrei aufgebaut werden. Der ganze Meßaufbau steht deshalb auf einem Wägetisch, dessen schwere Platte auf vier luftgefüllten Gummipuffern ruht (Barry Controls SLM-1). Die Kulturschälchen mit den Zellen werden für die Versuche in einem Aluminiumhalter auf die Arbeitsbühne des Mikroskops gestellt. Die Pipette befindet sich in einem Pipettenhalter, der mit dem von Hamill et al. (1981) beschriebenen identisch ist (Fig. 12). Oben befindet sich ein BNC - Stecker. An seinen inneren Pol ist ein chlorierter Silberdraht gelötet, der den Kontakt zur Pipettenlösung herstellt. Seitlich ist ein Schlauch angebracht, durch welchen mit einem Mundstück oder einer 10 ml - Spritze ein Unter- oder Überdruck angelegt werden kann. Die Pipette wird durch Anziehen eines Dichtringes luftdicht und mechanisch fest gehalten.

Der Meßverstärker befindet sich in einem kleinen Aluminiumgehäuse, welches eine BNC- Buchse zur Aufnahme des Pipettenhalters trägt. Das Verstärkergehäuse ist auf einem hydraulischen Mikromanipulator (Fa. Narishige) montiert, der an einem schwenkbaren Arm befestigt ist, um einen raschen Pipettenwechsel zu ermöglichen. Der hydraulische Manipulator erlaubt sehr gleichmäßige, kontrollierte Bewegungen der Pipette. Dies ist wichtig, weil ruckartige Sprünge (z.B. eines elektrischen Schrittmotors) die Pipettenspitze leicht in die Zelle eindringen lassen würden. Der Antrieb des Manipulators steht auf einem Nebentisch, damit beim Betätigen keine Erschütterungen auf das Präparat übertragen werden. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden bei Zimmertemperatur (18 - 22° C) durchgeführt, so daß auf eine Thermostatisierung des Präparats verzichtet werden konnte. Die Temperatur im Kulturschälchen wurde mit einem Thermistor überwacht.

Fig. 12. Pipettenhalter für Patch - Clamp - Versuche (aus Hamill et al. 1981).

- A Aluminium - Bauteile
 - A₁ Gehäuse
 - A₂ Abschirmung (optional)
 - A₃ Kappe
- Ag chlorierte Silberdraht - Elektrode
- BNC Steckkontakt
- O₁, O₂ Elastomer - Dichtringe
- P Pipette
- S Schlauchanschluß für Unterdruck
- T₁, T₃ Teflon - Bauteile
 - T₁ Körper
 - T₃ Steckerfassung
- T₂ Schraubkappe aus Plexiglas
- T_d Gewinde



3.1.2.3. Elektrischer Aufbau. Für Patch - Clamp - Untersuchungen sind mittlerweile sehr komfortable Verstärker im Handel (z.B. List EPC-5). Sie bieten unter anderem automatischen Nullabgleich, Kapazitätskompensation, eigene Spannungs- und Testsignalquellen und nachgeschaltete Verstärkung bei höheren Frequenzen. Sie sind jedoch nicht billig. Deshalb wurde ein einfacher Verstärker selbst aufgebaut, dessen Schaltbild in Fig. 13 gezeigt ist. Die Anforderungen an einen Patch - Clamp - Verstärker wurden von Hamill et al. (1981) beschrieben. Das Ziel ist, bei möglichst geringem Verstärkerrauschen eine möglichst große Bandbreite, und damit gute Zeitauf-
 lösung, zu erreichen. Entscheidend sind dabei der Rückkopplungswiderstand R_f und die dazu parallel liegende Kapazität C_f , zu der auch parasitäre Streukapazitäten erheblich beitragen. Als Verstärker wurde ein monolithischer Operationsverstärker mit MOS- Eingangsstufe gewählt (Burr - Brown OPA 103 AM), der als einfacher Strom - Spannungs - Wandler betrieben wird. Der Rückkop-
 pelungswiderstand ist ein Chip - Widerstand (Fa. Eltec) mit $R_f = 1 \text{ G}\Omega$. Dieser Widerstand zeichnet sich durch eine besonders kleine Parallelkapazität aus (Herstellerangabe 0.2 pF), so daß auch ohne nachträgliches Anheben der höheren Frequenzen eine Bandbreite von etwa 5 kHz erreicht wird. In der Regel wurde das Signal am Eingangsverstärker des Oszillographen mit dem dort eingebauten Vorfilter auf 3 kHz Bandbreite gefiltert. Das Strom-
 rauschen des Verstärkers war dann kleiner als 0.5 pA (RMS) .

Um äußere Störeinflüsse fernzuhalten, befindet sich der ganze Meßaufbau in einem Abschirmgehäuse aus Aluminiumblech und der Meßverstärker wird aus zwei eigenen 12 V Akkumulatoren mit Strom versorgt. Beim Aufnehmen

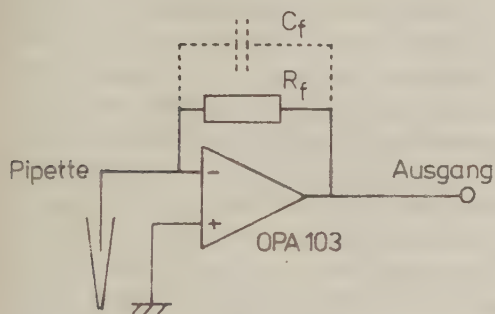


Fig. 13. Patch - Clamp - Verstärker (Strom - Spannungs - Wandler). R_f , C_f siehe Text.

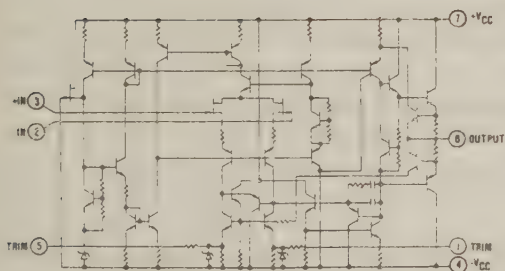


Fig. 13a. Schaltbild des Operationsverstärkers OPA 103 (aus Datenblatt der Firma Burr - Brown)

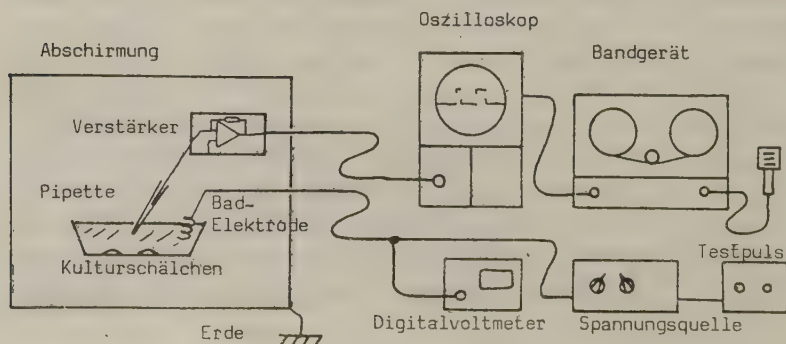
von Meßsignalen auf Band wurde zusätzlich ein geerdeter Blechschild um das Präparat gestellt, um von vorn einstreuenden Netzbrumm fernzuhalten. Zur Kontaktierung der Salzlösungen wurden einfache chlorierte Silberdraht - Elektroden verwendet.

Der gesamte elektrische Meßaufbau ist schematisch in Fig. 14 gezeigt. Die Stromsignale werden auf einem Speicheroszilloskop (Tektronix 5111) betrachtet und auf einem FM- Analog - Bandgerät (Racal 4DS) zur weiteren Verarbeitung gespeichert. Aus der Bandbreite des Verstärkers ergibt sich auch die Bandgeschwindigkeit, die zur Aufnahme der Meßspuren erforderlich ist. Die Bandbreite des Gerätes Racal beträgt bei 60 ips (Zoll pro Sekunde) Bandgeschwindigkeit 40 kHz, bei 7.5 ips also 5 kHz. Alle Meßdaten wurden deshalb mit der Bandgeschwindigkeit 7.5 ips aufgenommen.

Bei Patch - Clamp - Versuchen wird die gewünschte Membranspannung (Klemmspannung) häufig an den nichtinvertierenden Eingang des Operationsverstärkers gelegt (Hamill et al. 1981), damit die Badlösung direkt geerdet werden kann. Hier wurde dagegen der Einfachheit halber die Spannung an die Badlösung angelegt, gegen den invertierenden Eingang des Verstärkers als virtuelle Erde. Bei hinreichend kleinem Innenwiderstand der Spannungsquelle sind dadurch keine zusätzlichen Störeinflüsse zu erwarten.

Zur Messung des Pipettenwiderstandes und zur Kontrolle der Bildung von Gigaseals wurde ein abschaltbarer, rechteckiger Testpuls mit 1 - 10 Hz und 1 mV Amplitude zur angelegten Spannung addiert (Hamill et al. 1981).

Fig. 14. Elektrischer Meßaufbau für Patch - Clamp - Versuche.



3.1.3 Vorzeichenkonvention

Bei elektrophysiologischen Untersuchungen ist es üblich, die Spannung des Zellinneren anzugeben, bezogen auf die umgebende Außenlösung als Referenzpotential oder Erde. Ein positiver Membranstrom fließt, wenn Kationen aus dem Zellinneren austreten (oder Anionen in die Zelle einströmen). Bei der Präsentation der experimentellen Ergebnisse in dieser Arbeit wird dieser Konvention gefolgt. Bei Patch - Clamp - Versuchen müssen je nach Ableitkonfiguration unterschiedliche Vorzeichen gesetzt werden, wenn die Ergebnisse dementsprechend dargestellt werden sollen. Bei Outside - Out - Patch und Whole - Cell - Ableitungen entspricht die Pipettenlösung dem intrazellulären Medium und die Außenseite der Membran ist der Badlösung zugewandt. Eine an die Pipette angelegte Spannung hat also das korrekte Vorzeichen, und eine an die Badlösung (gegen die Pipettenlösung als virtuelle Erde) angelegte Spannung muß mit umgekehrtem Vorzeichen berücksichtigt werden. Ein Ausstrom von Kationen aus der Pipette ist ein positiver Membranstrom. Beim Inside - Out - Patch sowie beim Cell - attached Patch entspricht die Pipettenlösung dem extrazellulären Medium. Deshalb muß das Vorzeichen einer an die Pipette gelegten Spannung umgekehrt werden, und eine am Bad angelegte Spannung hat das richtige Vorzeichen. Ein Einstrom von Kationen in die Pipette bedeutet dann einen positiven Strom. Bei Cell - attached Ableitungen muß zusätzlich das Ruhepotential der Zelle berücksichtigt werden. Sein (in aller Regel negativer) Wert muß zum angelegten Potential addiert werden, um die über den Patch abfallende Spannung zu erhalten.

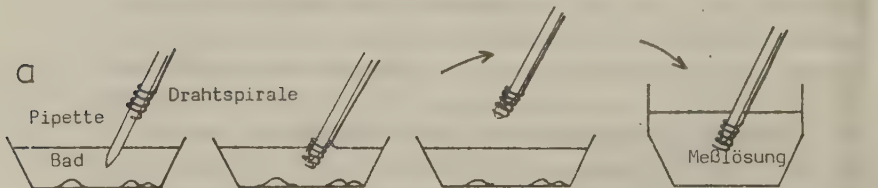
3.1.4. Verbesselter Lösungsaustausch: die 'flying patch' - Methode

In den von der Zelle gelösten Ableitkonfigurationen 'Inside - out Patch' und 'Outside - out Patch' (Fig. 11) kann die Salzlösung auf der Innen- bzw. Außenseite der Patch - Membran während des Versuchs ausgetauscht werden. In der Praxis ist es aber nicht ganz einfach, einen raschen und vollständigen Lösungswechsel zu erreichen, da die Pipettenspitze und der Patch stets von Lösung bedeckt sein müssen. Daneben besteht das Risiko, die im Kulturschälchen verbleibenden Zellen durch häufigen Lösungswechsel zu beschädigen oder, z.B. durch Pharmaka, für weitere Versuche unbrauchbar zu machen. Sind die Zellen auf Deckgläschen kultiviert, so kann für jeden Versuch ein neuer Splitter mit 8 bis 10 frischen Zellen genommen werden (Hamill et al. 1981). In Bochum ist es mir jedoch nicht gelungen, die Muskelzellen auf Glasunterlagen zu züchten. Ein vollständiger mehrmaliger Austausch der Badlösung im Kulturschälchen dauert relativ lange und benötigt etwa 10 ml Meßlösung. Der Patch kann auch in einen Lösungsstrom gehalten werden,

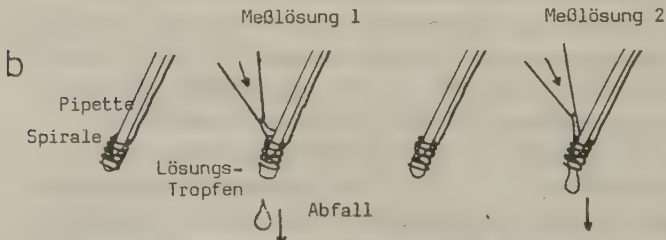
der aus einer zweiten Pipette austritt (Barrett 1982). Dabei kann der Patch jedoch beschädigt werden und ein vollständiger Lösungstausch ist nicht sicher gewährleistet.

Von mir wurde eine sehr einfache Methode gefunden, um einen isolierten Patch aus dem Kulturschälchen zu nehmen und einer gewünschten Folge von Meßlösungen auszusetzen. Dazu wird der Pipettenhalter mit einer Spirale aus chloriertem Silberdraht versehen, die entlang dem Schaft der Pipette verschoben werden kann (Fig. 15a). Nach Erhalt eines isolierten Patch wird die Spirale über die Pipettenspitze gesenkt und zusammen mit der Pipette aus dem Bad gehoben. Die Pipettenspitze und der Patch befinden sich dabei in einem Lösungstropfen, der durch seine Oberflächenspannung in der Drahtspirale gehalten wird. Die Pipettenspitze kann nun in ein bereitstehendes Schälchen mit der gewünschten Meßlösung getaucht werden. Der Lösungsaustausch erfolgt sehr schnell, weil die neue Meßlösung durch die locker gewundene Spirale leicht Zutritt findet. Der Austausch ist

Fig. 15 Verfahren zum verbesserten Austausch von Meßlösungen.



Transfer des Patch, der sich in einem von der Oberflächenspannung gehaltenen Lösungstropfen befindet, in eine andere Meßlösung.



Effizienter Lösungsaustausch am 'flying patch'. Das Volumen des Lösungstropfens ist etwa 50 μ l.

jedoch nicht ganz vollständig, denn bei einem Tropfenvolumen von 50 μl und 5 ml Meßlösung wird die ersetzte Lösung nur um den Faktor 100 verdünnt.

Noch vorteilhafter ist es deshalb, die chlorierte Silberdraht - Spirale selbst zur Referenzelektrode zu machen. Dann können Einzelkanalfluktuationen registriert werden, während sich der Patch im frei hängenden Lösungstropfen befindet ('flying patch'). Ein Austausch der Meßlösung ist nun sehr einfach. Die neue Meßlösung wird mit einer Spritze oder Pasteurpipette von oben in die Drahtspirale eingefüllt, wobei die alte Lösung verdrängt wird und nach unten abtropft. Dies erlaubt einen vollständigen und mehrfachen Lösungsaustausch innerhalb von wenigen Sekunden (Fig. 15b). Für einen Lösungswechsel werden nur einige 100 μl Lösung benötigt, und der Lösungsvorrat wird nicht mit der alten Salzlösung kontaminiert. Dies ist besonders wichtig, wenn zum Beispiel nur in kleinen Mengen verfügbare Pharmaka untersucht werden sollen. Wichtig ist ebenfalls, daß die im Kulturschälchen zurückbleibenden Zellen vom Lösungsaustausch nicht betroffen sind und für weitere Versuche zur Verfügung stehen.

3.1.5. Die Patch - Pipetten

Die Herstellung von Patch - Clamp - Pipetten ist von Hamill et al. (1981) beschrieben worden. Detailliertere technische Hinweise und eine grundsätzliche Diskussion der verschiedenen verwendbaren Glassorten finden sich bei Corey und Stevens (1983). Das Verfahren wird deshalb hier nur kurz skizziert.

3.1.5.1. Pipettenherstellung. Ausgegangen wird von vorgefertigten, etwa 75 mm langen Glaskapillaren mit 1,6 mm Außendurchmesser und etwa 0,3 mm Wandstärke. Die Pipetten werden auf einem Vertikalpuffer (David Kopf 700 C) in zwei Stufen gezogen. Dabei wird die vom Hersteller gelieferte Chromnickel - Heizwicklung mit 2 1/2 Windungen verwendet. Im ersten Ziehschritt wird der Zug durch einen untergelegten Kunststoffblock gestoppt, bevor das erweichte Glas abreißt. Dadurch wird die Kapillare in der Mitte auf etwa 200 μm Außendurchmesser verjüngt. Die dünnste Stelle wird dann in den oberen Teil der Heizwicklung gebracht. Diese Einstellung wird ebenfalls mit einem Kunststoffblock reproduzierbar gemacht. Im zweiten Ziehschritt wird die Kapillare bei geringerer Heizleistung in zwei verwendbare Pipetten getrennt. Kritisch ist die Einstellung des Heizstromes beim zweiten Ziehschritt, weil dadurch der Innendurchmesser der Pipettenöffnung festgelegt wird. Ein größerer Heizstrom führt zu einer feineren Öffnung. Gute Patch - Pipetten haben Öffnungen im Bereich 1-2 μm (Hamill et al. 1981).

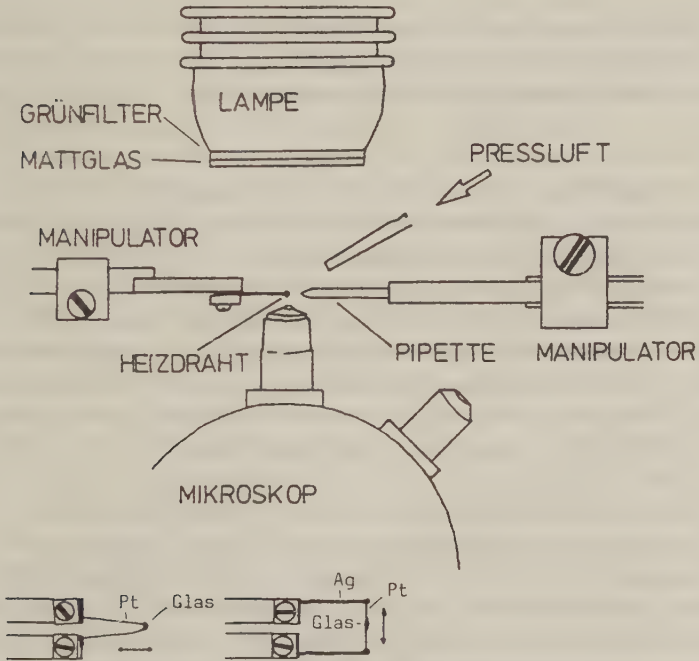
Für diese Arbeit wurde weiches Flintglas (CEEBE Hematocrits, Ch. Bardram, Kopenhagen) sowie Hartglas (Borosilikatglas unbek. Herkunft) verwendet. Das Weichglas läßt sich relativ leichter bearbeiten und wird bereits in den gewünschten Abmessungen geliefert. Es ergibt eine konische Pipettenform, die für Patch - Clamp - Versuche sehr gut geeignet ist. Die relativ hohe elektrische Leitfähigkeit des Weichglases führt aber zu erheblichem Stromrauschen, wenn die Pipetten nicht mit Sylgard beschichtet wurden (Corey und Stevens 1983). Die Herstellung von Pipetten aus Hartglas erwies sich als etwas umständlicher. Das Glas lag in längeren Stangen vor und mußte in 75 mm lange Stücke zerteilt werden. Um Beschädigungen der AgCl-Elektrode oder des Dichtringes (s. Fig. 12) beim Pipettenwechsel zu vermeiden, wurden die scharfen Bruchkanten in der Bunsenflamme feuerpoliert. Bei Hartglas ist die Einstellung des Heizstromes beim zweiten Ziehschritt sehr kritisch. Die Pipetten haben eine gerade Form und neigen dazu, beim Feuerpolieren etwas unregelmäßig zu werden. Dafür besitzt das Hartglas wesentlich bessere elektrische Eigenschaften und trägt zum Stromrauschen nur wenig bei. Für die Versuche am Calcium - abhängigen Kalium - Kanal wurden von mir meist unbehandelte Pipetten aus Weichglas verwendet, da bei der großen Amplitude der Einzelkanalströme das zusätzliche Stromrauschen nicht allzu sehr ins Gewicht fiel.

Die Spitzen der frisch gezogenen Pipetten werden auf der Mikroschmiede feuerpoliert. Dies sorgt für eine glatte und saubere Glasoberfläche im Spitzenbereich und erleichtert dadurch sehr erheblich die Bildung von Gigaseals. Zur Füllung werden die Pipetten mit ihrer Spitze in die gefilterte Salzlösung getaucht. Eine kleine Menge Lösung steigt durch die Kapillarwirkung in die Pipette auf. Anschließend wird die Pipette von hinten mit einer Spritze etwa 1 cm weit befüllt. Luftblasen werden durch Schütteln und Schnippen der Pipette mit dem Fingernagel gelöst. In 150 mM KCl-Lösung hat eine gute offene Patch - Pipette einen Widerstand zwischen 2 und 5 M Ω .

3.1.5.2 Microforge. Die Spitzen der gezogenen Pipetten werden vor der Füllung feuerpoliert, um sie von Unebenheiten und scharfen Kanten zu befreien und eine frische glatte Glasoberfläche im Bereich der Öffnung zu erhalten. Dazu wird die Pipettenspitze kurz in die Nähe eines erhitzten Drahtes gebracht. Der Vorgang wird unter einem Mikroskop überwacht. Der hierzu erforderliche Aufbau wird als Mikroschmiede (Microforge) bezeichnet. Die von mir aufgebaute und verwendete Microforge ist in Fig. 16 schematisch gezeigt.

Die Microforge besteht aus einem Mikroskop mit Lichtquelle sowie geeigneten Halterungen für den Heizdraht und die Pipette. Alle Bauteile müssen fest auf eine massive Unterlage geschraubt sein. Diese ruht auf einem schweren, von Gebäudeschwingungen durch vier Druckluftpuffer (Barry Controls SLM-1) entkoppelten Wägetisch. Als Unterlage wurde eine 20 mm starke Aluminiumplatte gewählt. Das Mikroskop (Fa. Zeiss) ist daran auf einer schweren Aluminiumschiene waagrecht befestigt. Es besitzt einen Binokulartubus 1,25x und ist mit zwei Okularen KPL-W 10x ausgestattet. In einem Okular befindet sich eine Meßskala, um das genaue Positionieren der Pipette zu erleichtern.

Fig. 16. Microforge (Blick von oben).



Der Heizdraht kann auf verschiedene Weise montiert werden.

- a) Einfache Halterung, führt zu seitlicher Bewegung
- b) Gerade Halterung, weitgehend bewegungsfrei

Zum groben Einstellen der Microforge wird ein Objektiv 10x/0,22 verwendet, und zur Feineinstellung und für den eigentlichen Poliervorgang kommt ein Objektiv UD 40/0,65 c zur Anwendung. Die Vergrößerungen betragen also 125x und 500x. Bei dieser Vergrößerung kann man die Spitze der Pipette erkennen, den erreichten Poliergrad aber nur mit einiger Erfahrung beurteilen. Das Heiztischobjektiv UD 40 zeichnet sich durch erhöhte Wärmefestigkeit und einen großen Arbeitsabstand von etwa 6 mm aus. Dies erlaubt die Beobachtung des Heizdrahts und der Pipette während des Poliervorgangs. Als Lichtquelle dient eine normale Mikroskopleuchte mit einem Grünfilter, welches den Spektralbereich etwas einengt und zu kürzeren Wellenlängen verschiebt. Dies führt zu einer etwas verbesserten Auflösung der Pipettenspitze.

Der Heizdraht besteht aus Platin oder einer Platinlegierung und ist etwa 200 µm dick. Platin ist an der Luft beim Erhitzen etwas flüchtig und könnte sich auf der Pipettenspitze absetzen. Deshalb wird auf der Mitte des Drahtes eine Glasperle aufgeschmolzen, indem eine Pipette in direkten Kontakt mit dem heißen Draht gebracht wird. Der Heizdraht kann, einfach gebogen, in einen geeigneten Halter geschraubt werden (Fig. 16a). Dann bewegt der Draht sich beim Erwärmen aber auf die Pipette zu, was ein genaues Einstellen erschwert. Es ist deshalb vorteilhaft, den Platindraht gerade zwischen zwei etwas dickere Silberdrähte (etwa 0,5 mm Ø) zu spannen (Fig. 16b). Die thermische Ausdehnung des Platindrahtes führt dann nicht zu einer seitlichen Bewegung. Die zu polierende Pipette wird in eine mit Silikon-schlauch ausgekleidete Bohrung eines Halters gesteckt, der auf einem elektrischen Mikromanipulator montiert ist. Dadurch kann die Pipette einfach in das Sehfeld und in die Nähe des Heizdrahtes gebracht werden.

3.1.5.3. Poliervorgang. Das Feuerpolieren der Pipettenspitze kann auf zwei Arten erfolgen. Eine Möglichkeit ist, die Pipette langsam in die Nähe des bereits heißen Drahtes zu bringen. Der Poliervorgang wird im Mikroskop beobachtet und die Pipette im richtigen Augenblick wieder zurückgezogen. Dabei sollte ein leichter stetiger Luftstrom gegen den Heizdraht gerichtet sein, um einen steilen und stabilen Temperatur - Gradienten zu erzeugen. Dann wird nur die äußerste Spitze der Pipette erweicht. Diese Methode erlaubt es, jede Pipette einzeln genau im gewünschten Maße zu polieren, erfordert aber viel Aufmerksamkeit und Fingerspitzengefühl. Die zweite Möglichkeit ist, die Pipette an den kalten Heizdraht heranzuführen, der dann durch einen definierten Strompuls kurz erhitzt wird (M. Bechem, pers. Mitteilung). Die Dauer des Strompulses wird durch einen elektronischen

Zeitschalter festgelegt. Die Stromstärke und der optimale Abstand zwischen Pipette und Heizdraht werden in einigen Vorversuchen bestimmt, wobei jeweils einige Pipetten geopfert werden müssen. Danach erlaubt diese Methode, viele Pipetten nacheinander genau gleich zu polieren. Voraussetzung dafür ist, daß der Heizdraht, wie in Fig. 16b gezeigt, unbeweglich montiert wurde. Dafür kann der zusätzliche Luftstrom bei dieser Methode entfallen.

3.2. Zellkultur von Myotubes

Als biologisches Präparat für diese Arbeit wurden kultivierte embryonale Skelettmuskelzellen ('myotubes' oder 'myoballs') der Ratte verwendet*. Diese erregbaren Zellen lassen sich mit etablierten Verfahren kultivieren und wurden deshalb für die Entwicklung der Patch - Clamp - Technik ein Standardpräparat. Im Gegensatz zu aus adultem Gewebe präparierten Muskelfasern sind kultivierte Myotubes oder Myoballs frei von Oberflächenschichten. Sie erlauben deshalb ohne enzymatische Vorbehandlung die Bildung von Gigaseals (Hamill et al. 1981).

Bei der Herstellung von Myotubes für diese Arbeit wurde im wesentlichen nach bewährten Methoden vorgegangen (Horn und Brodwick 1980). Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen, in denen das Gewebe mit Trypsin dispergiert wurde, wurde hier meist Collagenase zur Isolierung der Zellen benutzt. Die Zellen werden aus dem Muskelgewebe neonataler (oder 1 - 2 Tage alter) Ratten isoliert. Etwa 8 bis 10 neugeborene Ratten werden getötet und in 70 % Alkohol gewaschen. Die enthäuteten Hinterbeine werden abgetrennt und in gekühltem PBS (Lösungen siehe Tabelle 3) gesammelt. Das Gewebe wird grob zerkleinert und 3x in PBS gewaschen. Die Gewebestücke werden in 30 ml Collagenaselösung für 60 Minuten bei 37° C unter ständigem Rühren aufgelöst. Die Suspension wird zur Entfernung von Knochen und Gewebsresten durch locker geschichtete Watte filtriert, auf 6 Zentrifugenröhrchen verteilt, mit je 5 ml FCS überschichtet und 10 Minuten bei 3000 U/min. zentrifugiert. Nach Dekantieren der Überstände werden die Zellen 1 - 2 mal in Kulturmedium gewaschen und anschließend in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zelldichte wird in einer Zählkammer bestimmt und ggf. durch Verdünnen mit Medium

* Für die ersten Versuche im Labor von Dr. B. Sakmann in Göttingen wurden Myoballs von Frau H. Karsten hergestellt. In Bochum wurden die Zellkulturen unter Anleitung von Dr. L. Pott mit technischer Hilfe von Frau J. Zwoycyk durchgeführt. Zusätzlich wurden einige Zellkulturen von Dr. G. Fels, Dortmund, zur Verfügung gestellt. Allen Genannten sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

auf 10^6 /ml eingestellt. Die Suspension wird dann auf Gewebekulturschälchen aus Kunststoff (Fa. Nunc, 35 mm Ø) verteilt (2 ml/Schälchen), und im Brutschrank (Fa. Heraeus) bei 37°C , 95 % Luftfeuchtigkeit und 1 vol-% CO_2 inkubiert. Nach etwa 5 Stunden haben sich die Zellen überwiegend am Boden abgesetzt und das Medium wird erstmals gewechselt, um Zellfragmente und Debris zu entfernen. Danach wird das Medium alle 2 - 3 Tage erneuert. Selbstverständlich werden alle Arbeitsschritte unter aseptischen Bedingungen (in einer Laminar - Flow - Haube, Fa. Prettl) durchgeführt.

Die Myoblasten wachsen und beginnen nach einigen Tagen, zu Myotubes zu fusionieren. Für Patch - Clamp - Versuche sind sie schon nach 5 - 6 Tagen verwendbar. Calcium - abhängige Kalium - Kanäle bilden sich jedoch erst etwas später aus, so daß die Zellen für diese Arbeit nach 10 - 12 Tagen am besten geeignet waren. Runde Myoballs anstelle von länglichen Myotubes erhält man durch Zugabe von Colchicin oder Vinblastin beim 3. oder 4. Medienwechsel (6. -9. Tag). Diese Zellgifte zerstören das Cytoskelett, so daß die Zellen eine gerundete Form annehmen, ohne ihre elektrischen Eigenschaften zu verlieren. Da Myoballs weniger kontraktile sind und eine geeignetere Form haben, sind sie für Patch - Clamp - Versuche etwas bequemer zu handhaben als Myotubes. Um die Gefahr von Beeinträchtigungen des Zellwachstums möglichst gering zu halten, wurde hier auf diese Behandlung meist verzichtet, und die Versuche wurden direkt an Myotubes durchgeführt.

Die Zelldichte ist kritisch für den Erfolg der Präparation. Ist sie zu klein, so wird die Fusion der Zellen beeinträchtigt und es bilden sich

Tabelle 3. Lösungen und Medien für die Zellkultur

PBS	Phosphate Buffered Saline, Fa. Boehringer
FCS	Fetal Calf Serum, Boehringer
HS	Pferdeserum, Boehringer. Es erwies sich als notwendig, das Pferdeserum für 30 min. bei 54°C zu inaktivieren und anschließend zu filtrieren
M199	Grundmedium, Fa. Boehringer, HEPES - gepuffert
SP	Strptomycin 100 µg/ml + Penicillin 100 U/ml
AraC	Cytosin - Arabinosid
Kulturmedium	100 Teile M199, 10 Teile FCS, 10 Teile HS, 1 Teil SP
Collagenase	Fa. Sigma, Typ 2158, 1 mg/ml in PBS + 0.1 mM CaCl_2
Trypsin	Fa. Boehringer, Fertiglösung 0.1 %

nur wenige und sehr kleine Myotubes. Ist sie zu groß, so löst sich der Zellrasen ab und die Kultur wird unbrauchbar. Ein Problem bei der Kultivierung von Muskelzellen ist die Gegenwart von Fibroblasten, die aus Knochen- und Bindegewebe herausgelöst werden. Sie vermehren sich in der Kultur sehr rasch und können die Muskelzellen völlig überwuchern. Um den Anteil an Fibroblasten zu verringern, wird die Zellsuspension vor dem Verteilen auf Kulturschälchen 10 - 15 Minuten in größeren Petrischalen inkubiert (Blondel et al. 1971). In diesem Zeitraum heften sich die Fibroblasten bereits vorzugsweise am Boden an, während die Myoblasten noch in Suspension bleiben. Es zeigte sich, daß dieses differentielle Absetzen nicht eintritt, wenn die Zellen allein mit Collagenase dispergiert wurden. Um ein Abtrennen der Fibroblasten nach dieser Methode zu ermöglichen, wurde der Enzymlösung deshalb für die letzten 10 min. etwas Trypsin zugesetzt. Um die Zellteilung der Fibroblasten in der Kultur zu hemmen, kann dem Nährmedium beim 2. Wechsel (3. Tag) AraC zugesetzt werden. Davon wurde nur Gebrauch gemacht, wenn auffallend viele Fibroblasten vorhanden waren.

3.3. Bestimmung der Calciumkonzentration

Die intrazelluläre Calciumkonzentration in der Muskelzelle ist im Ruhezustand sehr klein (etwa $0.1 \mu\text{M}$) und steigt während der Kontraktion des Muskels bis auf etwa $50 \mu\text{M}$ an (Lüttgau und Glitsch 1976). Die Herstellung von Meßlösungen mit gut definierten Calciumkonzentrationen in dieser Größenordnung ist ein schwieriges Problem.

3.3.1 Problematik der Calciumbestimmung

Calciumionen sind ubiquitär. Selbst in Quarzgerät doppelt destilliertes Wasser enthält noch bis zu $1 \mu\text{M Ca}^{++}$, und normale Glasflaschen geben im Laufe der Zeit beträchtliche Mengen Calcium an die Meßlösungen ab. Käufliche Salze enthalten stets signifikante Spuren von Calcium, zum Beispiel KCl der Qualitätsstufe 'pro Analysis' laut Herstellerangabe (Baker) bis zu 0.004 Gew.-% Ca. Dies erscheint wenig, kann aber in einer Meßlösung mit 150 mM KCl schon zu Calciumkonzentrationen bis $10 \mu\text{M}$ führen. Es bedarf deshalb besonderer Anstrengungen, um eine genaue Angabe der freien Calciumkonzentration im μM -Bereich und darunter zu erhalten. Eine direkte Titration des Calciums ist dabei nicht möglich, und Atomabsorptionsspektroskopie oder Flammenphotometrie können nicht zwischen freiem und etwaigem gebundenen Calcium unterscheiden.

Es gibt Methoden, um freie Calciumkonzentrationen in biologischen Lösungen zu bestimmen (Blinks et al. 1982). Dazu gehören ionenselektive Elektroden (Tsien und Rink 1980), das in Gegenwart von Calcium fluoreszierende Protein Aequorin (Shimomura et al. 1963), Calcium - bindende Farbstoffe wie Arsen-azo-III oder Murexid (Blinks et al. 1982) und Calcium - abhängige Enzymsysteme (Scharff 1979). Die letzten drei Methoden haben gemeinsam, daß sie mit geeichten Meßlösungen kalibriert werden müssen, die auf der Basis eines Calcium - Puffersystems hergestellt werden. Die Empfindlichkeit von ionenselektiven Elektroden kann aus der Nernst - Gleichung (Gl. 1) theoretisch hergeleitet werden, wird in der Praxis aber stets anhand von Calcium - Puffern verifiziert, weil bei sehr kleinen Calciumkonzentrationen die Gegenwart anderer Ionen (Na^+ , K^+) zu Abweichungen vom idealen Verhalten führt.

3.3.2. Das Calcium - EGTA - Puffersystem

Für Untersuchungen an Calcium - abhängigen Ionenkanälen ist deshalb der naheliegende Schluß, die gewünschten Calciumkonzentrationen in den Meßlösungen durch einen Calcium - Puffer einzustellen. Hierzu eignen sich in ganz besonderer Weise die organischen Chelatbildner ('Komplexone'). Diese Substanzen bilden in wässriger Lösung sehr stabile Komplexe mit spezifischen Metallionen. Für Calcium gut geeignete Chelatbildner, die verbreitete Anwendung gefunden haben, sind EDTA und EGTA. EGTA hat gegenüber EDTA den Vorteil einer höheren Spezifität für Calcium (Sillen und Martell 1964). Während Calcium aus dem EDTA- Komplex durch Magnesium verdrängt werden kann, spielt dies bei EGTA und bei physiologischen Mg^{++} - Konzentrationen praktisch keine Rolle. Dies vereinfacht die Berechnung der freien Calciumkonzentration. Als vierbasige organische Säure existiert EGTA in wässriger Lösung in verschiedenen Formen, die mit Protonen im Gleichgewicht stehen. Nur die vollständig ionisierte Form, EGTA^{4-} , vermag Ca^{++} mit hoher Affinität zu binden. Die effektive Konzentration an EGTA^{4-} ist im physiologischen pH- Bereich aber relativ klein und stark vom pH abhängig. Die Berechnung der freien Ca^{++} - Konzentration ist eine direkte Anwendung des Massenwirkungsgesetzes und von Blinks et al. (1982) ausführlich dargestellt worden. Aus den tabellierten Bindungskonstanten des EGTA für Ca^{++} und Protonen wird für die pauschale Reaktion



eine vom pH abhängige apparente Bindungskonstante K_{app} bestimmt. Der Wert von K_{app} hängt außerdem - weniger stark - von der Temperatur und der Ionen-

stärke ab. Bisherige Versuche, Ca-EGTA Pufferlösungen zu kalibrieren und mit anderen Meßmethoden zu vergleichen wurden von Trube (1981) zusammengestellt. Trube empfiehlt bei physiologischen Salzkonzentrationen den Arbeitswert $pK_{app} = 6.40 + 0.2$ (pH - 7.0), der zur Berechnung von Calcium - Pufferlösungen für diese Arbeit verwendet wurde.

3.3.3 Ca^{++} - gepufferte Meßlösungen

Die in dieser Arbeit eingesetzten Ca^{++} - Pufferlösungen sind in Tab. 4 aufgeführt. Um mögliche Nebeneffekte des Chelatbildners gering zu halten, wurde die EGTA- Konzentration auf 1 mM festgesetzt. Die Pufferwirkung ist maximal bei etwa 200 nM freiem Ca^{++} , wo die Hälfte des EGTA gebunden ist, und läßt oberhalb von 2 μM freiem Ca^{++} nach. Die kleinste erreichbare Ca^{++} - Konzentration hängt von der Hintergrundkonzentration an Calcium ab und beträgt bei 5 μM Gesamt - Calcium etwa 1 nM freies Ca^{++} . Bei höheren gepufferten Ca^{++} - Konzentrationen spielt die Hintergrundkonzentration keine wesentliche Rolle. Um gepufferte Ca^{++} - Konzentrationen im Bereich 5 - 50 μM zu erhalten, wurden auch Pufferlösungen mit NTA (Nitrilotriessigsäure) hergestellt, weil NTA eine geringere Affinität für Ca^{++} besitzt als EGTA. In Gegenwart von NTA war es jedoch nicht möglich, Gigaseals zu erhalten. Unklar ist, ob dies auf NTA selbst oder auf Verunreinigungen derselben zurückgeht.

Die durch EGTA- Puffer vorgegebenen Ca^{++} - Konzentrationen sind einer Reihe von Fehlerquellen ausgesetzt. Die Calcium - Hintergrundkonzentration in den Salzlösungen ist nicht sicher bekannt. Sie wurde auf 5 μM geschätzt. Nach Trube (1981) beträgt die Ca^{++} - Bindungsfähigkeit von käuflichem EGTA nur etwa 94 % der Theorie, diese Feststellung wurde von mir nicht überprüft. Die größte Fehlerquelle ist sicher die Ungenauigkeit der pH- Bestimmung, denn bereits eine Änderung des pH- Wertes um 0.05 Einheiten wirkt sich merklich auf pK_{app} und damit exponentiell auf $[Ca^{++}]$ aus.

Tabelle 4. Calciumkonzentrationen in den verwendeten mit EGTA gepufferten Meßlösungen.

Alle Lösungen enthielten 150 mM KCl, 3 mM HEPES, pH 7.2, und 1 mM EGTA.

nominelle freie $[Ca^{++}]$:	1 nM	50 nM	1 μM	2 μM
Gesamt - Calcium:	ca. 5 μM	200 μM	830 μM	900 μM

Es wäre deshalb gut gewesen, die errechneten Ca^{++} -Konzentrationen mit einer unabhängigen Methode zu überprüfen. Die oben angeführten Verfahren sind jedoch teilweise recht aufwendig und werden ihrerseits gegen Ca^{++} -EGTA-Puffer kalibriert. Dabei zeigen sie oft erhebliche Streuungen (Trube 1981). Deshalb hätten solche Messungen die Verlässlichkeit der Ca^{++} -Konzentrationsangaben nicht verbessert.

3.3.4. Abschätzung der Calcium - Hintergrundkonzentration

Im Ergebnisteil dieser Arbeit wird deutlich, daß der hier untersuchte Kalium - Kanal eine ausgeprägte und über einen weiten Konzentrationsbereich streng exponentielle Calciumabhängigkeit seiner Kinetik zeigt. Dadurch stellt er selbst eine gute Meßsonde für die Konzentration an freiem Calcium dar. Die oben geschätzte Angabe von 5 μM für die Calcium - Hintergrundkonzentration in den verwendeten KCl-Lösung basiert deshalb auf Messungen der Kinetik des Kanals in ungepufferten Calcium - freier Meßlösung im Vergleich zu den quantitativen Ergebnissen in gepufferten Lösungen.

3.4. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Einzelkanalfluktuationen wurde mit dem Computer (Fa. Digital MINC-11/23) durchgeführt. Für die einzelnen Schritte der Auswertung wurden FORTRAN - Computerprogramme erstellt.

3.4.1. Methode

Bei Messungen am Calcium - abhängigen Kalium - Kanal traten neben den offenen und geschlossenen Zuständen, deren Kinetik in erster Linie untersucht werden sollte, sehr oft auch Flicker und desensitivierte Zustände auf, die aufgrund ihres Leitwertes nicht vom geschlossenen Zustand getrennt werden konnten. Deshalb war eine vollständige Matrix - Analyse der Daten nicht möglich, und die Auswertung mußte auf die mittlere Öffnungswahrscheinlichkeit und die Zustands - Lebensdauern beschränkt werden. Es kam also das eingeschränkte Auswertverfahren (s. Abschnitt 2.3.3.4.) zum Einsatz. Die Lebensdauer der desensitivierten Zustände war meist sehr viel länger als die der geschlossenen Intervalle, so daß in der Regel schon bei der Vorauswahl der Daten eine Beschränkung auf die Bursts möglich war. Der Flicker - Prozeß war dagegen für eine Analyse viel zu schnell. Deshalb wurde der offene Zustand R_o unter Einschluß der Flicker definiert. Dies ist eine Vereinfachung des Reaktionsschemas gemäß Abschnitt 2.2.2. und legitim, wenn der Flicker - Prozeß sehr schnell ist. Waren die geschlossenen

Zustände deutlich länger als die Flicker, dann wurde eine Mindest - Lebensdauer für geschlossene Ereignisse gefordert, um die Flicker auszuschließen. Wenn dagegen die geschlossenen Zustände selbst sehr kurzlebig waren, wurde versucht, sie durch Anpassen einer Exponentialfunktion mit zwei Termen von den Flicker - Ereignissen zu trennen.

3.4.2. Datenerfassung

Vor der Computer - Analyse werden die auf Analogband gespeicherten Meßsignale am Oszilloskop gesichtet und auf ihre Eignung geprüft. Voraussetzung ist, daß die zu analysierenden Daten eine ausreichende Stromauflösung zeigen, um eine klare Trennung der offenen und geschlossenen Kanalzustände zu erlauben. Für eine automatische Analyse ist weiter erforderlich, daß die Bandaufnahmen relativ frei von Netzbrumm, externen Störimpulsen und Drift des Untergrunds sind. Je nach Zweck der Analyse kann es erforderlich sein, daß nur ein einziger Kanal zur gemessenen Stromfluktuation beiträgt. Bei Daten von einem Patch mit mehreren stark burstenden Kanälen ist es dann oft möglich, Stücke der Aufnahme mit nur einem aktiven Kanal für die Auswertung zu selektieren. Häufig treten in einem Patch zusätzliche Ionenkanäle eines anderen Typs auf, die eine lästige Störquelle darstellen und eine Bandaufnahme sogar unbrauchbar machen können. Bei der grossen Amplitude der Stromfluktuationen des hier untersuchten Kanals spielten solche Störungen aber eine untergeordnete Rolle.

Im ersten Schritt der Analyse werden die ausgewählten Bandaufnahmen über den Analog - Digital - Wandler in den Rechner eingegeben. Das Programm IPOREN mißt die Eingangsspannung am Wandler mit einer Taktzeit von 0.5 oder 1 ms und speichert die Folge der Meßwerte in einem File auf der Magnetplatte des Rechners ab. Kürzere Taktzeiten können virtuell durch langsames Abspielen des Bandes erreicht werden.

Im zweiten Schritt werden die digitalisierten Meßdaten mit dem Programm MNCSAN auf dem Video - Bildschirm des Rechners gesichtet und editiert. Dabei werden vor allem transiente Störungen (externe Schaltpulse, Membran - Durchbrüche u.a.m.) eliminiert und eine eventuell vorhandene Drift der Null - Linie kompensiert. Dies ist wichtig für die automatische Erkennung der Einzelkanalereignisse im nächsten Schritt. Es ist auch möglich, deutlich abgehobene Bursts bereits in dieser Phase zu selektieren oder Bereiche mit mehreren aktiven Kanälen auszusondern.

Die editierten Meßdaten werden mit dem Programm LPOREN auf Anzahl und Lebensdauer der Einzelkanal - Ereignisse ausgewertet. Es werden obere und untere Schranken festgesetzt, die das Stromniveau des offenen und geschlossenen Zustandes definieren. Zusätzlich kann für beide Zustände eine Mindest - Lebensdauer zur Elimination von Flickers gemäß Abschnitt 2.3.3.4 festgesetzt werden. Das Programm LPOREN sucht die Einzelkanal - Ereignisse in den digitalisierten Daten und erkennt sie daran, daß das Stromniveau die vorgegebenen Schwellenwerte überschreitet. Die Amplitude eines Ereignisses ist dabei als mittlere Differenz der zum Ereignis gezählten Meßwerte von der Null - Linie definiert. Die wie auf Seite 26 definierten Lebensdauern und die Amplituden der vom Programm gefundenen Einzelkanal - Ereignisse werden auf der Magnetplatte sequentiell in Form einer Tabelle gespeichert.

3.4.3. Statistische Analyse

Von der Tabelle der Einzelkanal - Ereignisse wird bei der statistischen Analyse mit weiteren Programmen ausgegangen. Die Ergebnisse werden dabei jeweils am Bildschirm oder als Plotter - Zeichnung ausgegeben. Das Programm SPOREN erzeugt ein Histogramm der Einzelkanal - Amplituden, und TPOREN erzeugt ein Lebensdauer - Histogramm. Ganz allgemein kann zu jeder Fragestellung, die an die experimentellen Ergebnisse herangetragen wird, ein entsprechendes Computer - Programm geschrieben werden. Die eigentliche Lebensdauer - Analyse wird mit dem Programm UPOREN durchgeführt. Es erstellt ein Lebensdauer - Histogramm, indem es die Anzahl von Ereignissen $n(k)$ zu jeder diskreten Lebensdauer k bestimmt. An die integrale Verteilung der Lebensdauern

$$(86) \quad N(\Delta t \cdot k) = \sum_{i=1}^k n(k)$$

wird dann in einem ungewichteten Least - Squares - Verfahren ein exponentielles Zerfallsgesetz

$$(87) \quad N(t) = N(0) \exp(-t/\tau)$$

angepaßt. Dabei ist τ die mittlere Lebensdauer der Einzelkanal - Ereignisse, die für die offenen (τ_o) und geschlossenen (τ_c) Ereignisse auf gleiche Weise bestimmt wird. Manchmal ist eine befriedigende Anpassung gemäß Gl. 87 nicht möglich, weil mehrere Klassen von geschlossenen Ereignissen vorkommen. Dann wird mit UPOREN zuerst die Lebensdauer der langsamsten Komponente bestimmt, die also bei längeren Zeiten die Verteilung dominiert. Mit WPOREN wird anschließend die bis auf $k = 0$ extrapolierte Verteilung der langlebigsten

Zustände von $N(\Delta t \cdot k)$ abgezogen und der verbleibenden Verteilung erneut eine Exponentialfunktion angepaßt. So können Verteilungen mit mehreren Zeitkonstanten der Form

$$(38) \quad N(t) = N_1(0) \exp(-t/\tau_1) + N_2(0) \exp(-t/\tau_2)$$

getrennt werden.

Neben den Ereignis - Lebensdauern wird vom Programm LPOREN auch die mittlere Öffnungswahrscheinlichkeit p_0 als Anteil der Meßpunkte, die dem offenen Zustand zugeschrieben wurden, ermittelt. Für einen einfachen Kanal mit zwei Zuständen gilt die Relation (Gl.54)

$$p_0 = \frac{\tau_o}{\tau_o + \tau_c}$$

welche wie auf Seite 34 beschrieben, eine Kontrolle der Resultate auf Konsistenz ermöglicht. Insbesondere ist die Bedingung in Gl. 54 für die experimentellen Ergebnisse dann nicht erfüllt, wenn aus Versehen längere desensitivierte Intervalle mit in die Analyse einbezogen wurden, die zu einer erheblichen Verfälschung von p_0 führen können.

4. Ergebnisse

4.1. Versuchsdurchführung

Der in dieser Arbeit untersuchte Kaliumkanal wurde von mir erstmals im Verlauf von Untersuchungen zur Kinetik des Acetylcholin - Rezeptorkanals von Myoballs gesehen, wo er sich in Form von großen, lästigen Störimpulsen bemerkbar machte (Fig. 17). Es zeigte sich bald, daß diesen großen Stromsprüngen ein reproduzierbarer Ionenkanal zugrundelag und es erschien interessant, diesen auffälligen Kanal genauer zu untersuchen. Da der Kanal in seinem qualitativen Erscheinungsbild dem von Marty (1981) untersuchten Ca^{++} -aktivierten K^{+} -Kanal von Rinder - Chromaffinzellen recht ähnlich sah, war es naheliegend, vor allem die Calcium - Abhängigkeit des neuen Kanals zu erforschen.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden in der Outside - Out - Patch - Konfiguration durchgeführt. Die Myoballs oder Myotubes wurden in Ringerlösung (150 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 3 mM HEPES, gepuffert auf pH 7.2) gebadet. Patch - Pipetten wurden mit KCl- Lösung (150 mM KCl, 3 mM HEPES, pH 7.2) oder mit Ca^{++} - EGTA- Pufferlösungen gemäß Tabelle 4 gefüllt. Nach Aufsetzen der Pipette und Erhalt eines Gigaseal in der On - Cell - Konfiguration wurde der Patch durch kurzes Saugen zerstört und die Pipette von der Zelle zurückgezogen, um einen Outside - Out - Patch

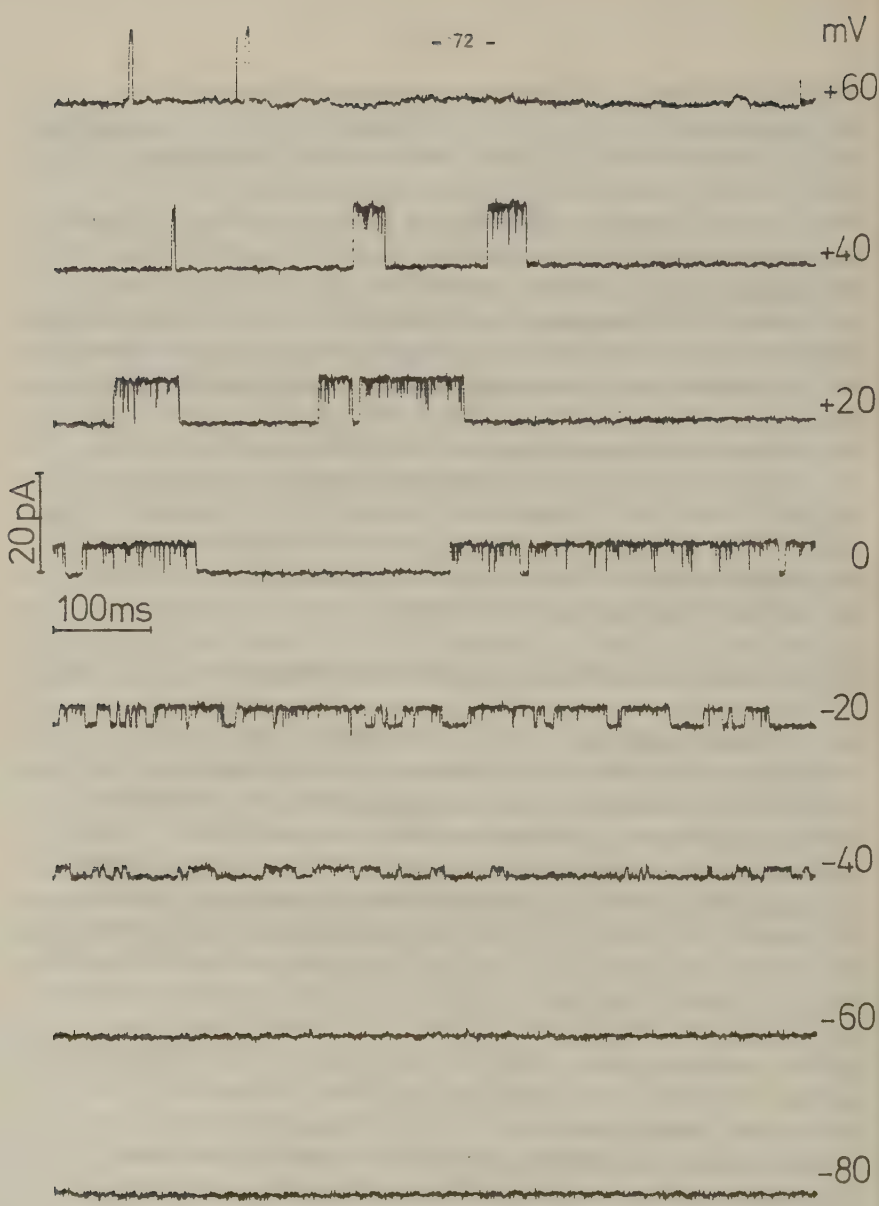
Fig. 17. Größenvergleich: Calcium - abhängiger Kalium - Kanal zwischen kleineren Stromsignalen des Acetylcholin - Rezeptorkanals bei -60 mV (offener Kanalzustand nach oben).



zu bilden. Unter den so erhaltenen Ableitbedingungen (außen NaCl, innen KCl, Membranpotential 0 mV) sind Ca^{++} -abhängige K^{+} -Kanäle deutlich sichtbar, sofern die Pipettenlösung Ca^{++} im μM -Bereich enthält. Bei kleineren $[\text{Ca}^{++}]$ treten die Kanäle erst bei positiven Membranpotentialen auf. Enthielt ein Patch keine Ca^{++} -abhängigen K^{+} -Kanäle, so wurden (hier nicht beschriebene) Experimente am Azetylcholin-Rezeptorkanal durchgeführt, der in fast allen von Myoballs entnommenen Patches vorkommt. Bei Vorhandensein von einem oder mehreren Ca^{++} -abhängigen K^{+} -Kanälen wurde entweder unter 'natürlichen' Ionenbedingungen gemessen (außen NaCl-Ringerlösung und innen KCl-Lösung), oder die Badlösung wurde ausgetauscht gegen KCl-Ringerlösung (150 mM KCl, 3 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 4 mM NaCl, 3 mM HEPES, pH 7.2), um symmetrische Bedingungen (innen und außen K^{+}) zu erhalten. In der Regel erwiesen sich die Patches unter natürlichen Ionenbedingungen mechanisch und elektrisch als etwas stabiler als in symmetrischen Lösungen. Die Calciumkonzentration in der K^{+} -Ringerlösung mußte gegenüber der der Na^{+} -Ringerlösung deshalb etwas erhöht werden, weil die Membran des Patch andernfalls mit KCl auf der Außenseite dazu neigte, leck zu werden.

4.2. Qualitative Beschreibung der Einzelkanal - Fluktuationen

Das typische Erscheinungsbild des Ca^{++} -abhängigen K^{+} -Kanals mit NaCl-Ringerlösung auf der Außenseite der Membran ist in Fig. 18 gezeigt. Der Kanal ist bei allen positiveren Spannungen als -60 mV als ein Kationen - Ausstrom (oder Anionen - Einstrom, was jedoch bei symmetrischer Cl^{-} -Konzentration und 0 mV angelegter Spannung schwer vorstellbar ist) sichtbar. Bei negativeren Potentialen treten keine meßbaren Stromfluktuationen auf. Mit 150 mM KCl auf beiden Seiten der Membran wird bei positiven Spannungen ein Kationen - Ausstrom und bei negativen Spannungen ein Einstrom beobachtet (Fig. 19). Diese Befunde lassen sich problemlos durch die Annahme erklären, daß der Kanal sehr selektiv für K^{+} -Ionen ist. In Figs. 18 und 19 ist deutlich erkennbar, daß die Kinetik des Kanals stark von der Membranspannung abhängt. Die genaue Art der Abhängigkeit erscheint verwirrend, weil es sich um zwei gegeneinanderlaufende Spannungsabhängigkeiten handelt. Von negativen zu positiven Spannungen werden die erst sehr kurzen offenen Ereignisse immer länger und die geschlossenen Intervalle immer kürzer, so daß schon bei +20 mV die Schließungen auf der Zeitskala von Fig. 18 oder 19 kaum mehr aufgelöst sind. Dagegen wird bei +20 mV erstmals die Gruppierung der Aktivität in Bursts deutlich, die mit zunehmender Spannung sehr rasch kürzer werden, während die Dauer der desensitvierten Intervalle



Stromfluktuationen eines Calcium - abhängigen Kalium - Kanals bei verschiedenen Spannungen. Fig. 18' (diese Seite) mit NaCl- Außenlösung und Fig. 19 (nächste Seite) mit KCl- Außenlösung. Weitere Angaben im Text (Abschnitt 4.2)

+80

+60

+40

+20

0

-20

-40

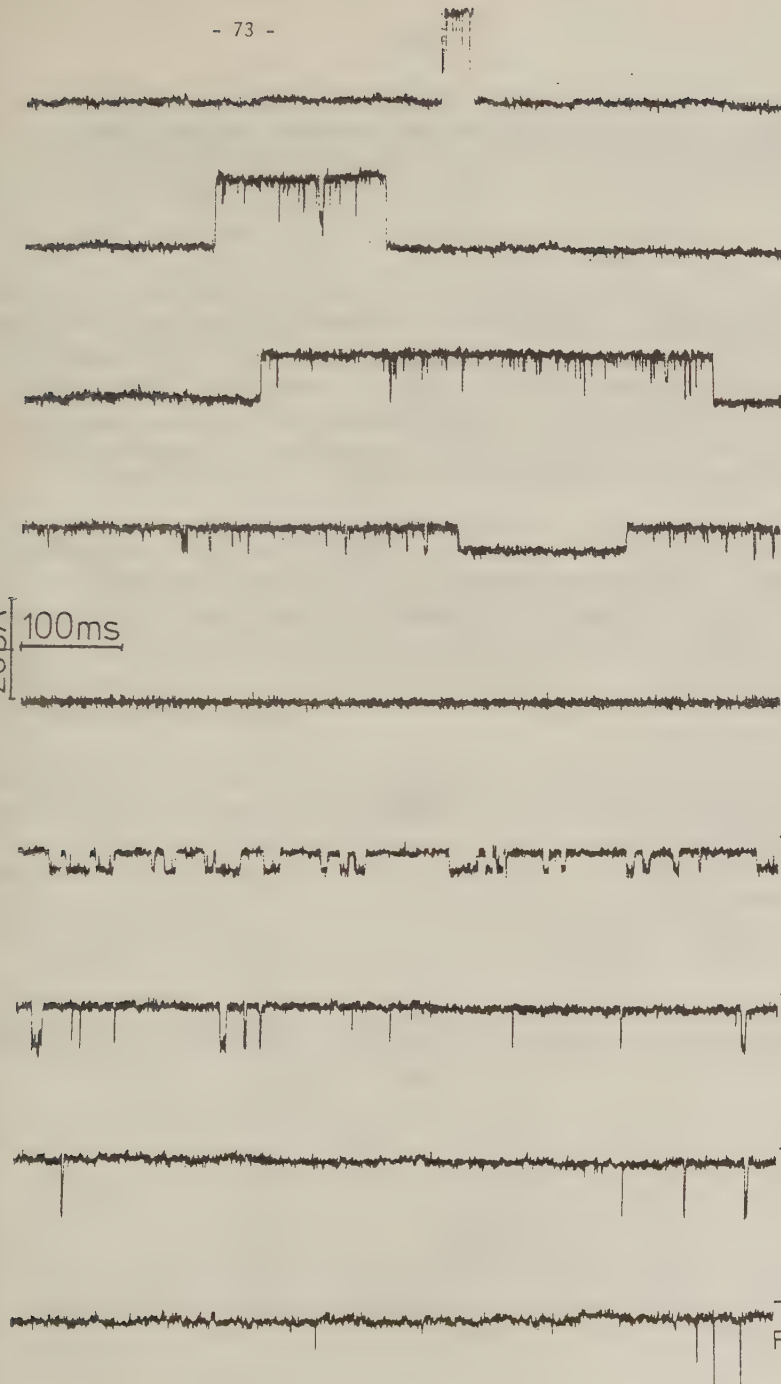
-60

-80

20pA
100ms

Fig. 19

50mV
100ms



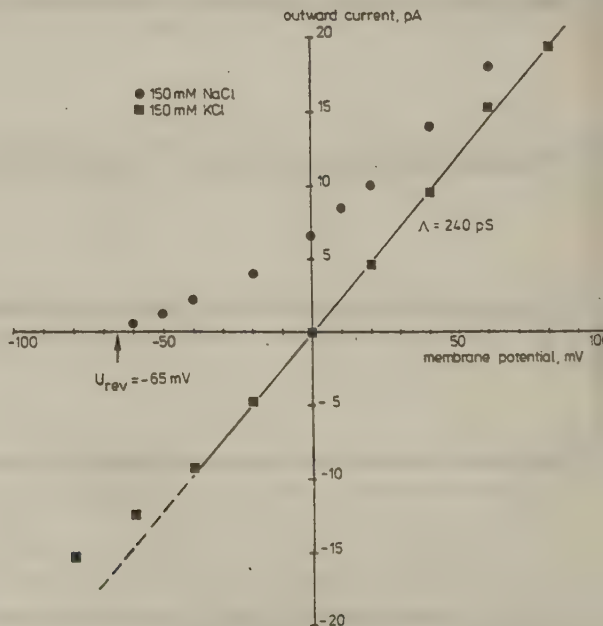
zwischen den Bursts stark zunimmt. Das Erscheinungsbild der Fluktuationen in Figs. 18 und 19 ist also bei negativen Spannungen durch das Öffnen des Kanals, bei positiven Spannungen dagegen durch den Burst - Prozeß bestimmt.

4.3. Leitwert und Ionenselektivität

Zur Bestimmung des Leitwertes des Kanals wurden Strom - Spannungs - Kennlinien aufgenommen. Der Leitwert ist als die Steigung dieser Kennlinie definiert. Eine Angabe des Leitwertes, formal gemäß dem Ohmschen Gesetz, als Quotient von Strom und Spannung bei einem Membranpotential kann dagegen zu Fehlern führen, weil etwaige Nichtlinearitäten übersehen oder die Ergebnisse durch einen Spannungs - Offset (Elektrodenpotentiale o.ä.) verfälscht werden.

In Fig. 20 sind die Strom - Spannungs - Kennlinien eines Ca^{++} - abhängigen K^{+} - Kanals mit NaCl- Ringerlösung und KCl- Ringerlösung als Außenmedium gezeigt. Mit KCl außen, also unter symmetrischen Bedingungen, ist die

Fig. 20. Strom - Spannungs - Kennlinien des Kanals mit KCl und NaCl auf der Außenseite der Patch - Membran (aus Methfessel und Boheim 1982)

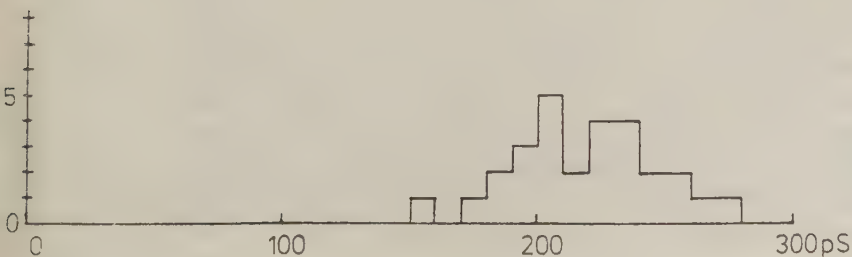


Kennlinie über einen weiten Spannungsbereich eine Gerade, der Kanal zeigt also Ohmsches Verhalten. Lediglich bei hohen hyperpolarisierenden Spannungen zeigt sich eine beginnende Sättigung. Mit 240 pS ist der Leitwert sehr hoch im Vergleich zu anderen Ionenkanälen. Mit NaCl-Ringerlösung außen, also unter natürlichen Ionenbedingungen, zeigt der Kanal eine nichtlineare Kennlinie mit deutlicher Gleichrichtung. Dies ist verständlich unter der Annahme, daß der Kanal Kaliumionen, aber keine Natriumionen passieren läßt. Bei sehr positiven Spannungen nähert sich die Kennlinie für asymmetrische Bedingungen an die für symmetrische Bedingungen gemessene Kennlinie an, da es sich dann in beiden Fällen um einen reinen Kalium - Ausstrom handelt. Bei hyperpolarisierenden Spannungen ist dagegen der Unterschied der Kennlinien maximal, weil der Kanal für Natrium praktisch impermeabel ist.

Eine interessante Beobachtung ist, daß der Leitwert des Kanals von einem Experiment zum anderen unterschiedlich ist, obwohl er für ein Experiment jeweils konstant bleibt. Fig. 21 zeigt die Verteilung der gefundenen Leitwerte in 28 Versuchen. Eine systematische Abhängigkeit des Leitwertes von der Calciumkonzentration oder anderen Parametern konnte nicht festgestellt werden. Auch die kinetischen Eigenschaften der Kanäle sind offenbar nicht mit dem Leitwert korreliert.

Das Umkehrpotential des Kanals ist die Spannung, bei welcher der offene Kanal keinen Netto - Ionenstrom transportiert, obwohl Ionen in beide Richtungen diffundieren können. Es wird, wenn der Kanal für mehrere Ionensorten permeabel ist, durch die Goldman - Gleichung gegeben. Mit KCl außen und innen liegt es für den Ca^{++} - abhängigen K^{+} - Kanal erwartungsgemäß bei 0 mV. Mit NaCl außen läßt sich das Umkehrpotential nicht direkt bestimmen,

Fig.21. Verteilung der Leitwerte des Kanals in 28 verschiedenen Versuchen in symmetrischen Bedingungen (beidseitig 150 mM KCl).



weil auch bei starken hyperpolarisierenden Spannungen kein Natrium - Einstrom meßbar ist. Das Umkehrpotential kann deshalb nur durch Extrapolation der Strom - Spannungs - Kennlinie abgeschätzt werden. Die extrapolierte Kennlinie schneidet die Abszisse bei etwa -65 mV. Sind nur zwei permeante Ionensorten vorhanden, so kann aus dem Umkehrpotential gemäß der Goldman - Gleichung b, das Selektivitätsverhältnis, bestimmt werden. Dabei wird von der im Experiment angebotenen Ionen - Verteilung ausgegangen und angenommen, daß der Kanal für Anionen unpassierbar ist.

$$(89) \quad E_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{b [K^+]_o + [Na^+]_o}{b [K^+]_i + [Na^+]_i} \right)$$

Mit $E_{rev} = -65$ mV wäre der Kanal für Kalium mindestens 15 - 20 mal durchlässiger, als für Natrium. In einigen Versuchen wurde die Außenlösung durch 150 mM CsCl ersetzt. Der Kanal ist für K^+ 4 bis 10 mal leichter permeabel, als für Cs^+ . Diese Werte stellen natürlich nur eine untere Grenze für das Selektivitätsverhältnis dar. Aus Beobachtungen an erschöpften Skelettmuskelfasern läßt sich auf wesentlich strengere Selektion des Kanals zwischen Kalium und Natrium schließen (Fink et al. 1983).

4.4. TEA - Blockade des Kanals

Es ist bekannt, daß Kaliumströme durch Membranen häufig mit Tetraäthylammonium - Ionen (TEA) blockiert werden können. Insbesondere ist dies für Calcium - abhängige Kalium - Ausströme beobachtet worden (Meech und Standen 1975). Es wird angenommen, daß TEA in das selektive Lumen eines Kalium - Kanals eintritt, aber nicht hindurchtreten kann. Um den Einfluß von TEA auf den Ca^{++} - abhängigen K^+ - Kanal zu testen, wurde der KCl - Ringerlösung auf der Außenseite der Membran eine kleine Menge TEA (etwa 5 mM) zugesetzt. Der Effekt ist in Fig. 22 gezeigt. Der Leitwert des Kanals ist in Gegenwart von TEA stark reduziert und dafür tritt ein deutliches Rauschen im offenen Kanalzustand auf. Dies ist konsistent mit der Annahme, daß TEA den Kanal blockiert, indem es den Durchtritt von K^+ - Ionen kompetitiv verhindert. Dabei wird TEA reversibel gebunden, so daß der Kanal in Gegenwart von TEA sehr schnell zwischen dem offenen TEA - freien und dem blockierten Zustand fluktuiert. Dies wird als starkes Rauschen im offenen Zustand sichtbar, weil einzelne TEA - Blockaden zeitlich nicht aufgelöst werden können. Die Lebensdauern der einzelnen offenen Ereignisse scheinen in Gegenwart von TEA verlängert zu sein. Dies ist ein wichtiges Resultat, denn es zeigt, daß nicht der TEA - blockierte Kanal, sondern nur der freie

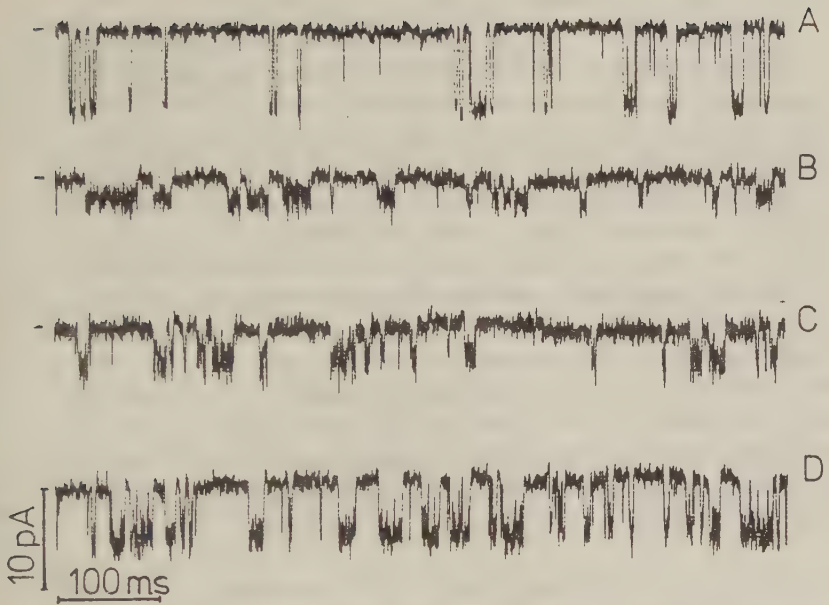


Fig. 22. Blockade des Ca^{++} -abhängigen K^{+} -Kanals durch TEA. Außenlösung 150 mM KCl- Ringerlösung, Spannung -40 mV. a) vor TEA- Zugabe b) nach Zugabe von TEA zur Außenlösung (ca. 5 mM). c) nach einmaligem Austausch mit TEA- freier Badlösung. d) nach mehrmaligem Austausch.

offene Kanal in den geschlossenen Zustand übergehen kann. Ein ähnlicher Effekt wird z.B. auch bei der Blockade des Acetylcholin - Rezeptorkanals durch das Lokalanästhetikum QX 222 beobachtet (Neher und Steinbach 1978). Bei Verringerung der TEA- Konzentration durch Austausch gegen TEA- freie KCl- Ringerlösung wird der gemessene Leitwert des Kanals wieder größer, und auch die Lebensdauern der Ereignisse normalisieren sich wieder (Fig. 22 c,d). Dabei ist erstaunlich, daß auch nach mehrmaligem Austausch, also bei Reduktion von $[\text{TEA}^{+}]$ in der Badlösung auf wenige μM , noch ein deutlicher TEA- Effekt bleibt. Auf einen möglichen Grund für diese Remanenz wird in der Diskussion eingegangen.

4.5. Blockade durch Co^{++} und andere Metall - Ionen

In mehreren elektrophysiologischen Arbeiten wurde gezeigt, daß Calcium - abhängige Kalium - Ausströme durch extern applizierte Co^{++} , Ni^{++} , oder La^{+++} - Ionen reduziert werden (Meech und Standen 1976, Heyer und Lux 1976). Deshalb wurde in einer Reihe von Versuchen am Ca^{++} - abhängigen K^+ - Kanal die Außenlösung (KCl- Ringerlösung) durch eine KCl- Ringerlösung mit zusätzlich einigen mM CoCl_2 ersetzt. Der Effekt ist in Fig. 23a-c gezeigt. In Gegenwart von Kobalt findet eine dramatische Reduktion der Aktivität des Kanals statt, wobei die Öffnungsdauer und vor allem die Öffnungsfrequenz stark verringert sind. Dabei ist der Leitwert des Kanals jedoch unverändert. Dies legt nahe, daß Kobalt - Ionen nicht, wie TEA, den Durchtritt von Kalium - Ionen behindern, sondern in das Schalten des Kanals eingreifen. Der Effekt von Kobalt ist völlig reversibel, denn nach Auswaschen des Co^{++} durch mehrmaligen Lösungsaustausch mit Co^{++} -freier KCl- Ringerlösung zeigte der Kanal wieder seine ursprüngliche Aktivität (Fig. 23d).

Solche Versuche wurden auch mit Nickel (Ni^{++})- und Lanthan (La^{+++})- Ionen durchgeführt. Mit Nickel setzte der Effekt bereits bei kleineren Konzentrationen als bei Co^{++} ein (Fig. 23e,f). Besonders drastisch und nur teilweise reversibel war die Wirkung von Lanthan (Fig. 23g,h).

Der Effekt von Kobalt und anderen Ionen kann auf verschiedene Weise gedeutet werden (s. Diskussion). Zur Klärung wäre es notwendig gewesen, eine Reihe von weiteren Versuchen, auch mit Co^{++} auf der Innenseite der Membran, durchzuführen. Es erschien jedoch vorteilhafter, gleich zu Versuchen mit gepufferter Calciumkonzentration überzugehen. Ein quantitatives Verständnis der Rolle des Calciums ist Voraussetzung für eine Erörterung möglicher Wirkungsmechanismen von Co^{++} und den anderen Metallionen auf diesen Kanal.

Fig. 23 (nächste Seite). Wirkung von Kobalt, Nickel und Lanthan auf die Kinetik des Kanals.

Außen KCl- Ringerlösung, Spannung -40 mV. Die Test - Ionen wurden der Außenlösung in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Kobalt (a-d): a) ohne Kobalt, b) 2 mM Co^{++} , c) 5 mM Co^{++} , d) nach Auswaschen.

Nickel (e,f): e) ohne Nickel, f) 1 mM Ni^{++} . Lanthan (g,h): g) ohne Lanthan, h) 1 mM La^{+++} . Bei den Versuchen mit Kobalt und Lanthan enthielt der Patch jeweils zwei Einzelkanäle, beim Nickel - Versuch nur einen Kanal.

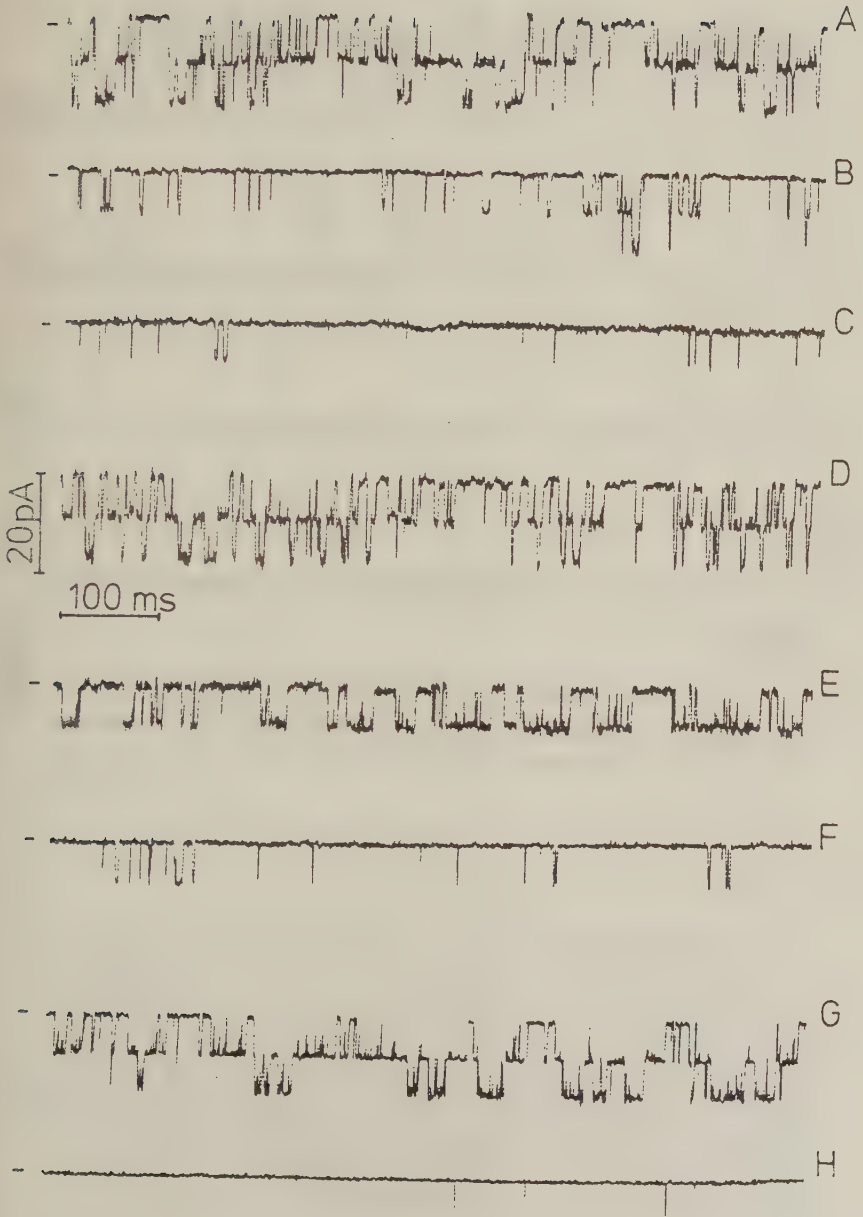


Fig. 23

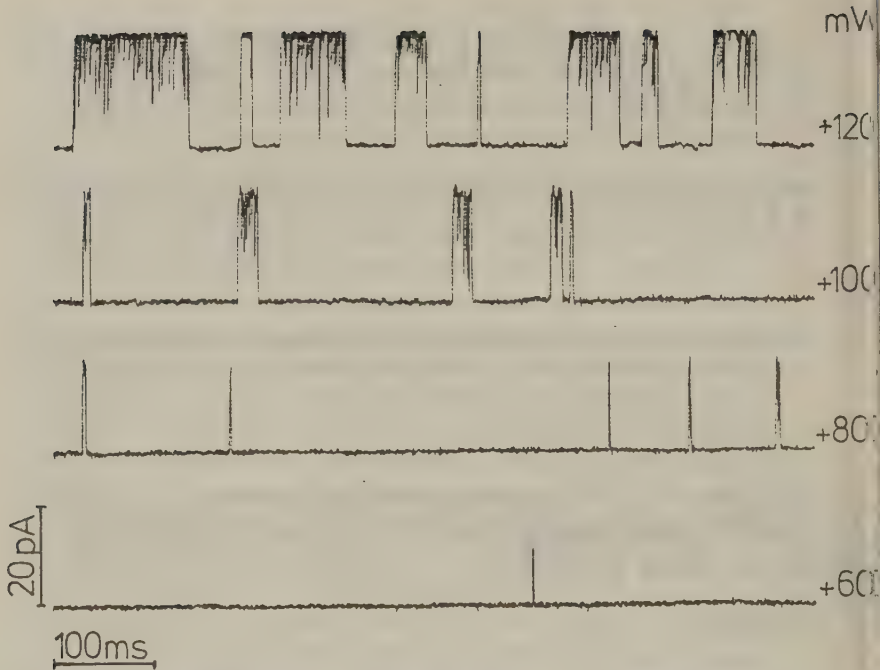


Fig. 24. Stromfluktuationen des Calcium - abhängigen Kalium - Kanals mit KCl- Ringerlösung außen und 150 mM KCl innen. Geschätzte Calciumkonzentration auf der Innenseite 1 nM.

4.6. Spannungs- und Calcium - Abhängigkeit der Einzelkanal - Kinetik

Bei den bisher beschriebenen Versuchen wurde eine Pipettenlösung verwendet, welcher kein Ca^{++} oder EGTA zugesetzt worden war. Die Calciumkonzentration auf der Innenseite der Patch - Membran war also einfach die Hintergrundkonzentration in der KCl- Meßlösung, die auf etwa $5 \mu\text{M}$ Ca^{++} geschätzt wurde. Um den Einfluß von intrazellulärem Calcium auf den Kanal quantitativ zu erfassen, wurden Meßlösungen mit gepufferter Calciumkonzentration gemäß Tabelle 4 als Pipettenlösung verwendet. In zusätzlichen Versuchen wurde eine auf $90 \mu\text{M}$ bzw. $200 \mu\text{M}$ erhöhte Ca^{++} - Konzentration in der Pipette angeboten. Die Wirkung auf die Kinetik des Kanals ist in Fig. 24 - 27 gezeigt.

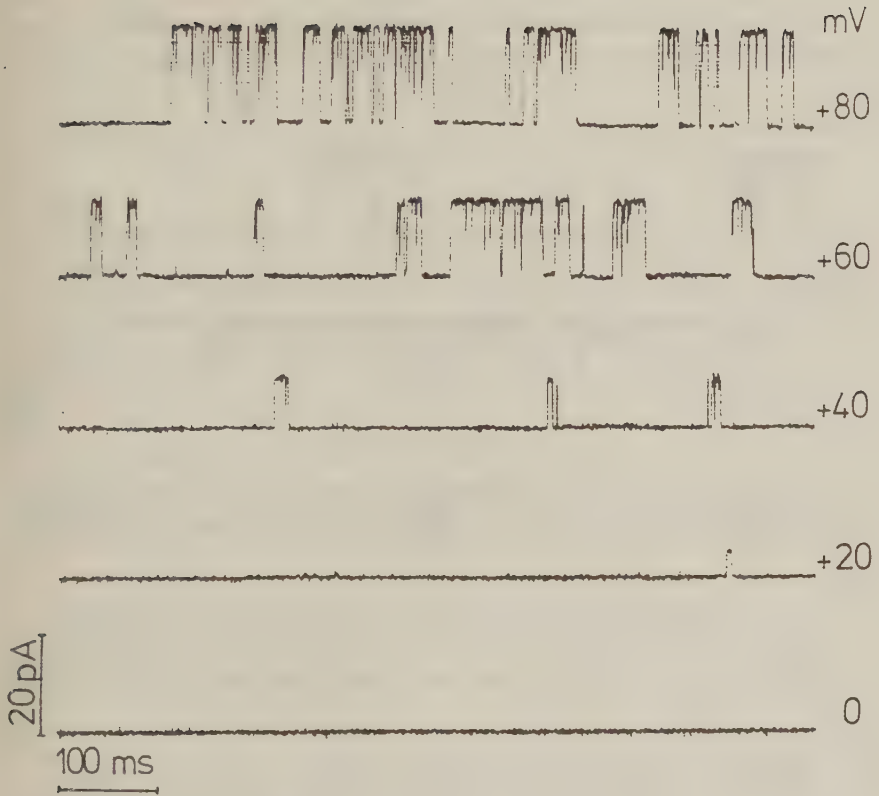


Fig. 25. Kanalfluktuationen bei einer nominellen Ca^{++} -Konzentration von 50 nM auf der Innenseite.

4.6.1. Qualitativ

Bei jeder Ca^{++} -Konzentration zeigt der Kanal eine vergleichbare Spannungsabhängigkeit seiner Kinetik. Bei negativeren Spannungen treten nur kurze offene Ereignisse auf, die zu positiveren Spannungen häufiger und länger werden. Bei hohen positiven Spannungen ist der Kanal innerhalb der Bursts fast ständig geöffnet, jedoch werden die Bursts selbst kürzer und bestimmen somit das Erscheinungsbild. Beim Vergleich der Bilder für verschiedene Calciumkonzentrationen wird deutlich, daß dieser charakteristische Effekt der Spannung in seiner Art erhalten bleibt, mit zunehmender Calciumkonzentration.

Fig. 26. Kanalfluktuationen bei nominell $1 \mu\text{M}$ freiem Ca^{++} auf der Innenseite der Membran.

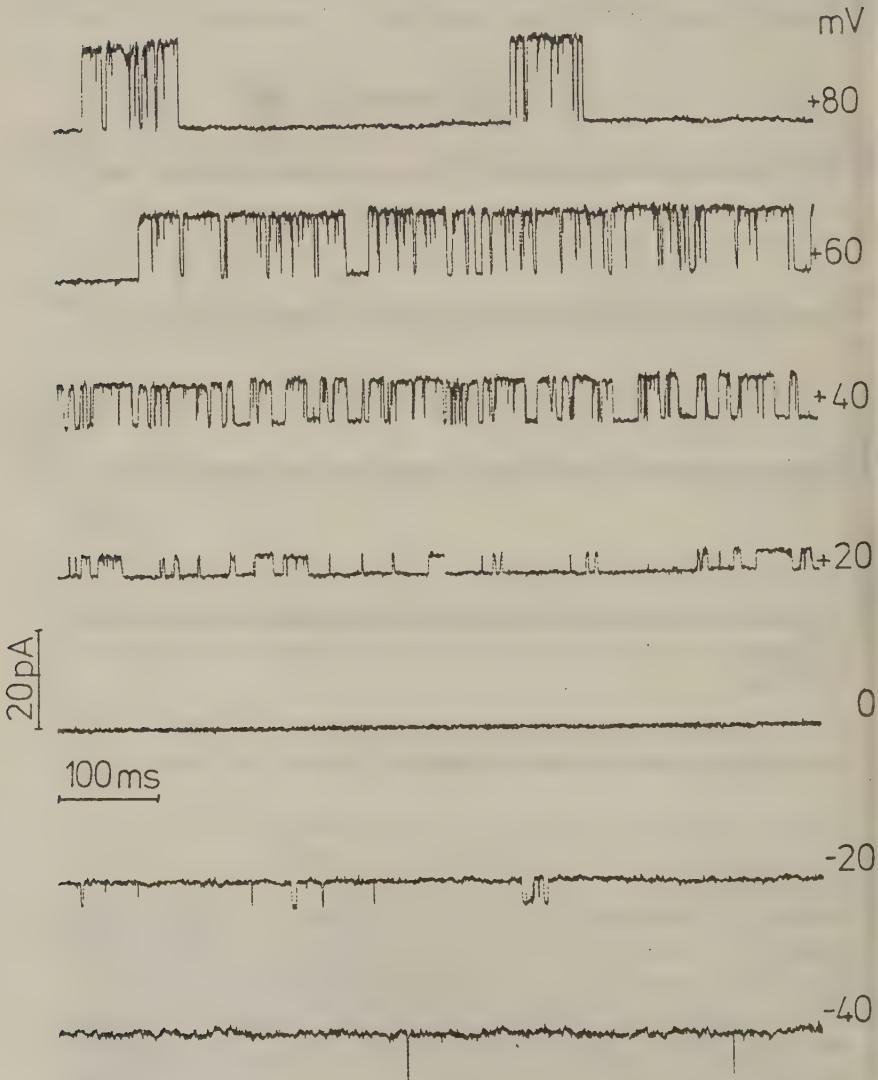
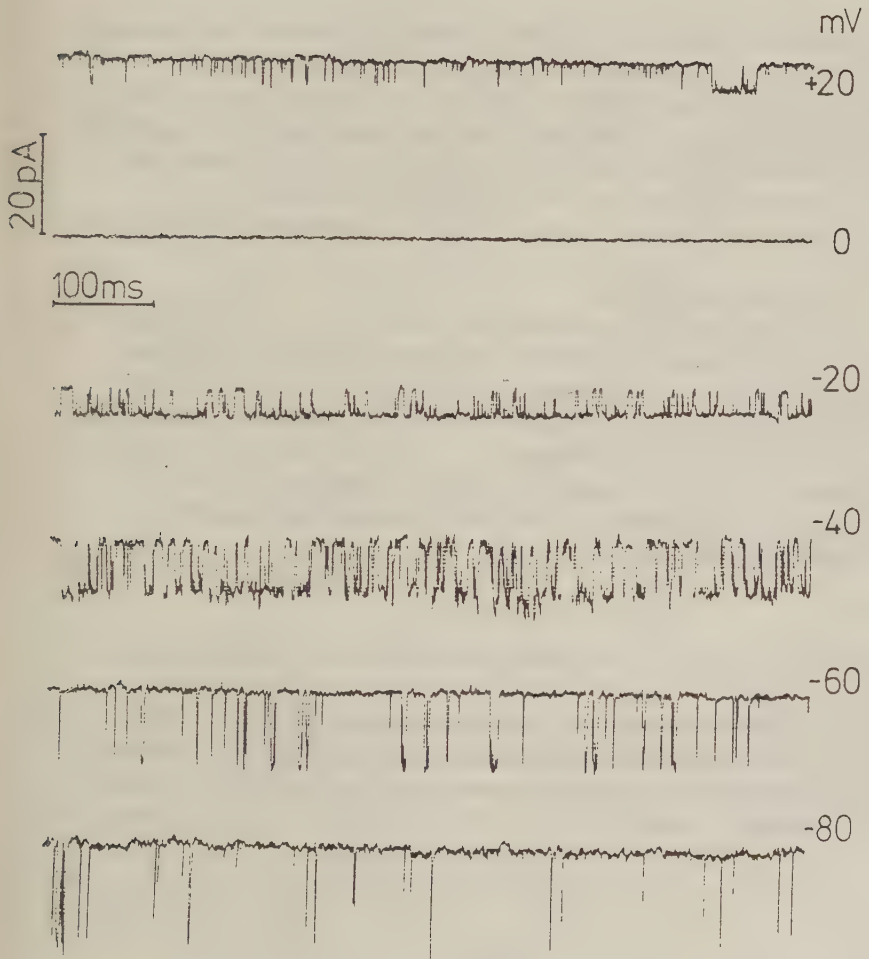


Fig. 27. Kanalfluktuationen mit 200 μM Calcium (ungepuffert)
an der Innenseite der Membran



tration aber zu negativeren Spannungen verschoben wird. Erste kurze Einzelereignisse werden zum Beispiel beobachtet für $1 \mu\text{M Ca}^{++}$ bei -60 mV , für 50 nM Ca^{++} bei $+20 \text{ mV}$, und für 1 nM Ca^{++} bei $+60 \text{ mV}$. Ein P_0 von etwa 50% (innerhalb der Bursts) wird gefunden für $200 \mu\text{M Ca}^{++}$ bei -40 mV , für $1 \mu\text{M Ca}^{++}$ bei etwa $+20 \text{ mV}$, für 50 nM bei $+80 \text{ mV}$, und für 1 nM wäre es erst jenseits von $+120 \text{ mV}$ zu erwarten, wobei die Patch - Membran einer derart hohen Spannung normalerweise nicht standhält.

Die richtige Zuordnung der sichtbaren Fluktuationen zu den in der Einleitung definierten Kanalzuständen ergibt sich dabei erst im Zusammenhang der Gesamtheit der Versuche. Die Spuren bei $1 \mu\text{M Ca}^{++}$, 80 mV und 50 nM Ca^{++} , 80 mV sehen zum Beispiel sehr ähnlich aus und lassen, isoliert betrachtet, keine besondere Calcium - Abhängigkeit des Kanals erkennen. In Wirklichkeit handelt es sich aber im ersten Fall um sehr kurze Bursts mit großem p_0 , und im anderen Fall um sehr stark von Flickers unterbrochene Einzelereignisse.

4.6.2. Gleichgewichtskonstante

Die Verschiebung der Kinetik entlang der Spannungsachse bei verschiedenen Calciumkonzentrationen wird besonders deutlich, wenn die Gleichgewichtskonstante $K = p_0/(1 - p_0)$ halblogarithmisch als eine Funktion der Spannung aufgetragen wird (Fig. 28). Diese Darstellung ist etwas weniger anschaulich als die häufigere lineare Auftragung von p_0 , dafür entspricht sie aber viel besser dem zugrundeliegenden physikalisch - chemischen Sachverhalt. Bei jeder Calciumkonzentration läßt sich die Spannungsabhängigkeit in guter Näherung durch den Ausdruck

$$(90) \quad K(V) = C \exp\left(\frac{a F}{R T} (V - V_0)\right)$$

beschreiben, wobei die durch lineare Regression aus den Datenpunkten ermittelte Steigung a in jedem Fall sehr dicht bei 2.0 liegt. Dies bedeutet, daß beim Öffnen des Kanals eine formale Gating - Charge von $2 \cdot e_0$ durch das elektrische Feld der Membran bewegt wird. Die Wirkung einer erhöhten Calciumkonzentration ist, die Kennlinien parallel zu negativeren Spannungen zu verschieben.

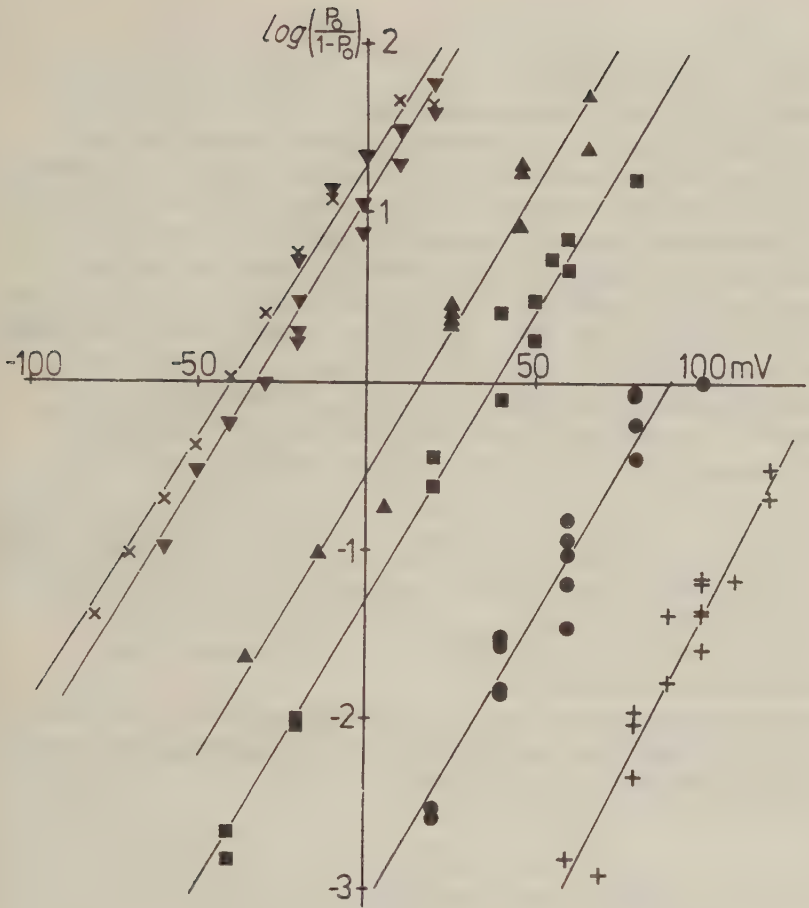


Fig. 28. Gleichgewichtskonstante $K = p_o / (1 - p_o)$ der Öffnungsreaktion für verschiedene Calciumkonzentrationen halblogarithmisch als Funktion der Spannung aufgetragen.

Calciumkonzentrationen gemäß Tabelle 4, für 90 μM und 200 μM ungepuffert. Die Geraden wurden den Meßdaten mit linearer Regression angepaßt. Ihre Steigungen sind auf der nächsten Seite tabelliert.

Calciumkonzentrationen:

200 μM x	90 μM ▼
2 μM ▲	1 μM ■
50 nM ●	1 nM +

4.6.3. Zustands - Lebensdauern.

Neben der mittleren Öffnungswahrscheinlichkeit p_o wurden auch die mittleren Lebensdauern der offenen und geschlossenen Zustände innerhalb der Bursts wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, mit dem Computer bestimmt. Die gefundenen mittleren Lebensdauern sind in Fig. 29 und 30 halblogarithmisch als Funktion der Membranspannung aufgetragen worden. Wie bereits in Fig. 28, wurden den Meßwerten mit linearer Regression Geraden angepaßt. Die Steigungen dieser Kennlinien liegen in allen Fällen sehr nahe bei $+1 \cdot F / RT$ bzw. $-1 \cdot F / RT$. Die Spannungsabhängigkeit des Öffnungsvorgangs verteilt sich also gleichmäßig auf Hin- und Rückreaktion, was der Vorstellung entspricht, daß wirklich geladene Gruppen eine symmetrische Energiebarriere überwinden müssen. Wie die Öffnungswahrscheinlichkeit verschieben sich auch die Kennlinien der Lebensdauern in charakteristischer Weise mit der Calciumkonzentration.

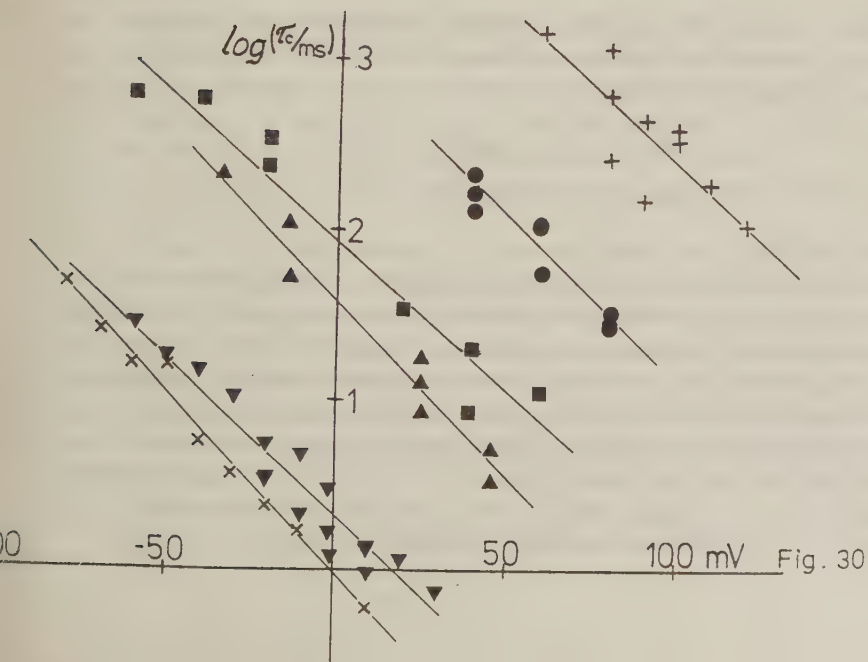
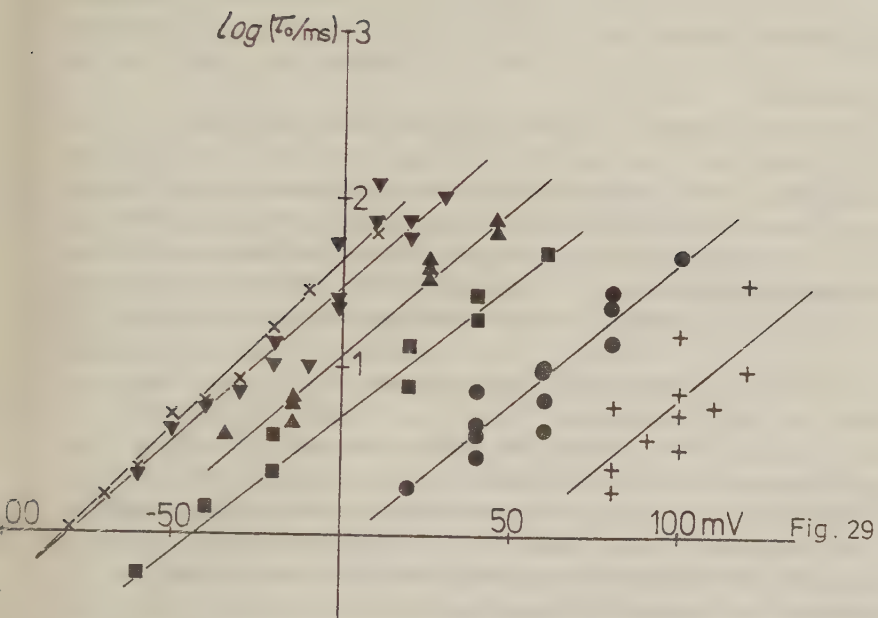
Fig. 29 (nächste Seite, oben): mittlere Lebensdauer des offenen Zustands

Fig. 30 (nächste Seite, unten) mittlere Lebensdauer des geschlossenen Zustands

Beide halblogarithmisch als Funktion der Spannung aufgetragen. Die Geraden wurden mit linearer Regression angepaßt, die Steigungen sind unten tabelliert. Calciumkonzentrationen wie in Fig. 28.

Tabelle 5. Steigungen der Regressionsgeraden aus Fig. 28, 29 und 30; bezogen auf F/RT

$[Ca^{++}]$	K (Fig. 28)	τ_o (Fig. 29)	τ_c (Fig.30)
ca.1 nM	2.23	1.04	-1.06
50 nM	2.01	0.99	-1.13
1 μ M	1.99	0.93	-1.03
2 μ M	1.97	1.02	-1.17
90 μ M	1.91	1.06	-1.07
200 μ M	1.86	1.14	-1.22



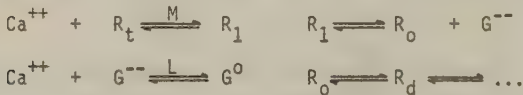
5. Diskussion

5.1. Kinetik des Kanals

Im Abschnitt 2.4 'Reaktionskinetik und Kanalmodelle' wurde eine Reihe von denkbaren Reaktionsprozessen vorgestellt, die beim Schalten von Ionenkanälen eine Rolle spielen können. Aus solchen Einzelreaktionen wurde ein Reaktionsschema aufgestellt, welches die Kinetik der Öffnungsreaktion des Calcium - abhängigen Kalium - Kanals richtig beschreibt.

Es ist klar, daß ein einfaches Aktivierungsmodell (Gl. 66), wie es von Latorre auf den Ca^{++} - abhängigen K^+ - Kanal von Kaninchen - Transversal - Tubuli angewandt wurde, nicht zutreffen kann. Es gibt zwar das Verhalten der Öffnungswahrscheinlichkeit P_o richtig wieder, indem es für zwei Ca^{++} - Bindungsstellen eine quadratische Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten K von der Calciumkonzentration fordert. Ein reines Aktivierungsmodell verlangt jedoch eine von Calcium unabhängige Lebensdauer des offenen Zustandes und bietet keine plausible Erklärung für die Äquivalenz der Wirkungen von Calcium und Membranpotential.

Dagegen wird das Verhalten des Kanals durch das bereits veröffentlichte (Methfessel und Boheim 1982) Aktivierungs - Blockade - Modell einsichtig und quantitativ richtig erfaßt. Das Reaktionsschema (Gl.79) lautete:



Voraussetzung für das Öffnen des Kanals ist demnach, daß ein Calciumion an einer Bindungsstelle mit niedriger Affinität ($M > 10^{-3}\text{M}$) gebunden wird. Diese Aktivierungs - Reaktion erklärt die Calcium - Abhängigkeit der mittleren Lebensdauer des geschlossenen Zustandes. Das eigentliche Öffnen des Kanals erfolgt dadurch, daß ein geladenes Gatter den Kanal verläßt und freigibt. Die negative Ladung des Gatters von $2 \cdot e_o$ ergibt sich aus der Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante K in Fig. 28. Das freie Gatter G^{2-} kann aus der Lösung mit hoher Affinität ($L < 10^{-7}\text{M}$) ein zweites Ca^{++} binden. Weil nur das Ca^{++} - freie, geladene Gatter den Kanal wieder verschließen kann, ist die Lebensdauer des offenen Zustandes mit zunehmender Calcium-

konzentration dadurch erhöht. Die gefundene Äquivalenzrelation für Ca^{++} und Spannung ist unmittelbar verständlich, weil beide Parameter gemeinsam an einer Struktur, dem geladenen Ca^{++} - affinen Gatter, angreifen.

Dieses Reaktionsschema macht quantitative Vorhersagen, welche anhand der Ergebnisse der statistischen Einzelkanal - Analyse kontrolliert werden können. Die mittlere Lebensdauer des offenen Zustands sollte für $[\text{Ca}^{++}]_i > L$ zur Calciumkonzentration proportional sein, und für $[\text{Ca}^{++}]_i < L$ von $[\text{Ca}^{++}]_i$ unabhängig werden. Die Lebensdauer des geschlossenen Zustandes sollte dagegen für $[\text{Ca}^{++}]_i < M$ proportional zu $[\text{Ca}^{++}]_i$ und erst bei sehr großen Calciumkonzentrationen, oberhalb von M , von $[\text{Ca}^{++}]_i$ unabhängig sein. Entsprechend sollte die Gleichgewichtskonstante K im Bereich $L < [\text{Ca}^{++}]_i < M$ quadratisch, und außerhalb dieses Bereichs linear, mit $[\text{Ca}^{++}]_i$ zunehmen.

Um diese Vorhersagen des Reaktionsschemas zu prüfen, sind in Fig. 31, 32 und 33 die Größen K , τ_o und τ_c als Funktion von $[\text{Ca}^{++}]_i$ in der Art eines Hill - Diagramms doppelt - logarithmisch aufgetragen. Um zufällige Schwankungen der einzelnen Messungen auszugleichen, wurden die Werte von den in Fig. 28, 29 und 30 berechneten Regressionsgeraden bei +60 mV abgelesen. Zur visuellen Orientierung sind an geeigneten Stellen Geraden mit Steigungen von 2 bzw. +1 oder -1 eingezeichnet worden.

Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung (Methfessel und Boheim 1982) lagen erst die Meßwerte für $[\text{Ca}^{++}]_i \leq 2 \mu\text{M}$ vor. In diesem Bereich werden die Voraussagen des Modells in der Tat vorzüglich durch die experimentellen Daten bestätigt. Aus der Lage der Knicke in den Auftragungen für K und τ_o läßt sich für die Ca^{++} - Bindungskonstante des Gatters der Wert $L = 2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ abschätzen, und τ_c ist über den ganzen Bereich, wie erwartet, etwa linear in $[\text{Ca}^{++}]_i$.

Durch Hinzunahme der neueren Versuche bei $[\text{Ca}^{++}]_i = 90 \mu\text{M}$ und $200 \mu\text{M}$ sowie einiger Werte für p_o von einer anderen Arbeitsgruppe (Barrett et al. 1982, offene Kreise in Fig. 31) ergeben sich jedoch neue Aspekte. Die Gleichgewichtskonstante K knickt offenbar bei deutlich kleineren $[\text{Ca}^{++}]_i$ ab, als erwartet wurde. Prinzipiell läßt sich allerdings gegen eine Ca^{++} - Bindungskonstante M von etwa 10^{-5} M , anstatt 10^{-3} M , für die Aktivierungsreaktion nichts vorbringen.

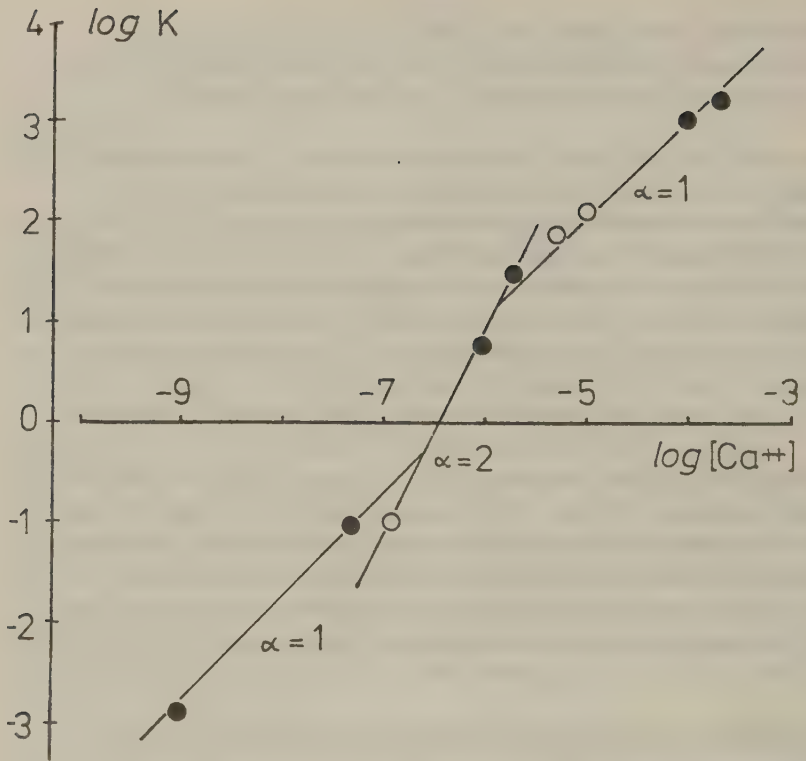


Fig. 31. Gleichgewichtskonstante $K = p_o/(1 - p_o)$ als Funktion der Calciumkonzentration doppelt - logarithmisch aufgetragen. Die Werte wurden bei + 60 mV von der (ggf. extrapolierten) Regressionsgeraden für die jeweilige Konzentration in Fig. 28 abgelesen. Offene Kreise sind Werte aus Barrett et al. (1982). Steigungen von 1.0 und 2.0 sind zur Orientierung eingezeichnet.

Fig. 32 und 33 (nächste Seite)

Mittlere Lebensdauer τ_o des offenen Zustandes (Fig. 32, oben) und τ_c des geschlossenen Zustandes (Fig. 33, unten) doppelt - logarithmisch als Funktion der Calciumkonzentration aufgetragen. Werte auf gleiche Weise wie oben, aber aus Fig. 29 bzw. 30 entnommen. Steigungen von +1.0 und -1.0 dienen zur Orientierung.

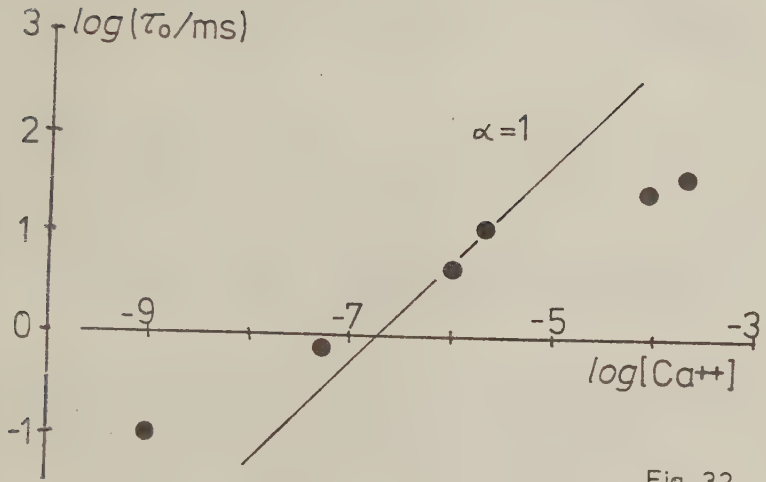


Fig. 32

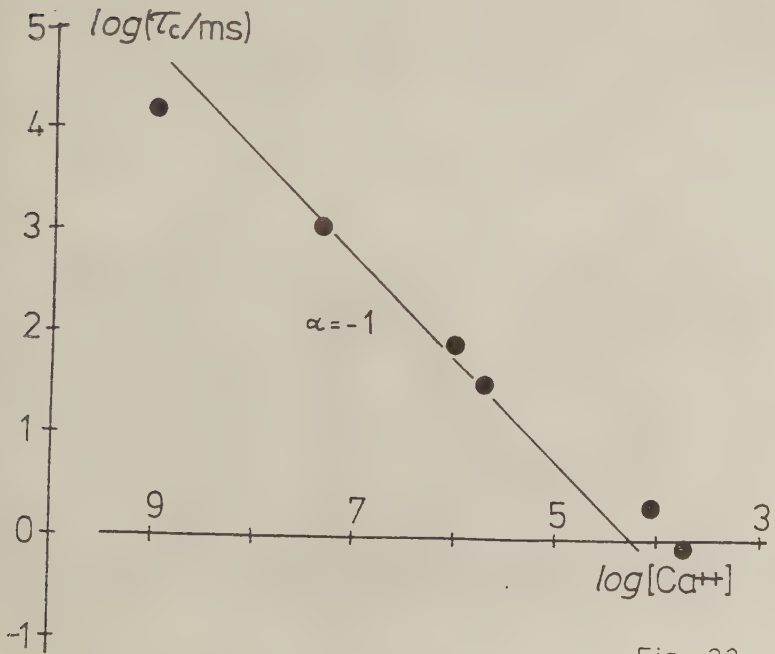


Fig. 33

Bei Betrachtung der Lebensdauern in Fig. 32 und 33 zeigt sich aber, daß τ_c über den ganzen Bereich linear mit $[Ca^{++}]_i$ abnimmt. Die Bindungskonstante der niedrigaffinen Bindungsstelle dürfte also doch wie erwartet im mM- Bereich liegen. Dagegen geht die Calcium - Abhängigkeit der Lebensdauer des offenen Zustandes oberhalb von etwa 10^{-5} M zurück, was im bisherigen Reaktionsschema nicht vorgesehen ist.

Um dieses zusätzliche Abknicken von τ_o zu erklären, muß auf die mögliche Struktur des Gatters näher eingegangen werden. Postuliert wurde ein Gatter, welches einerseits mit einer effektiven Ladung von $2 \cdot e_o$ durch den Kanal schlüpft, um ihn zu blockieren, und andererseits mit hoher Spezifität und Affinität Calcium aus der Lösung bindet. Bei genauerem Hinsehen ist klar, daß eine Peptidkette diese zwei Aufgaben nur dann beide wahrnehmen kann, wenn sie dazu jeweils unterschiedliche Konformationen annimmt.

Ein Hinweis, wie so eine Gatter - Struktur aussehen könnte, wird durch das Calcium - bindende Protein Calmodulin gegeben (Cheung 1982). Seine flexible, 148 Aminosäurenreste lange Peptidkette besitzt an vier Stellen stark geladene Teilsequenzen von je 10 bis 12 Aminosäureresten, welche Ca^{++} mit hoher Affinität binden können. Die ersten 32 Aminosäurereste des Calmodulins, mit einer solchen Ca^{++} - affinen Tasche, sind in Fig. 34 gezeigt und es soll unterstellt werden, daß es sich beim Gatter des Calcium - abhängigen Kaliumkanals um eine ähnliche Peptidsequenz handeln könnte.

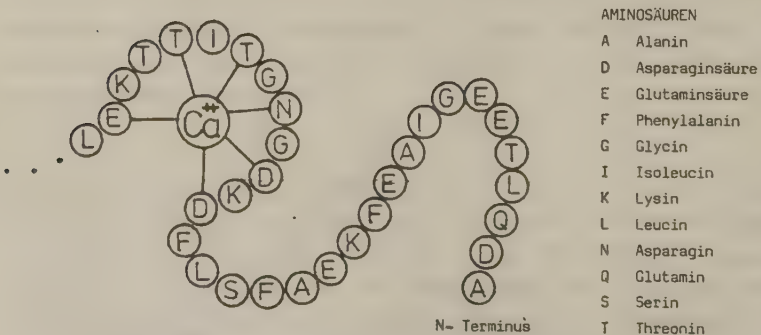


Fig. 34. Die N- terminale Peptidsequenz des Calmodulins mit einer Calcium - Bindungsstelle (nach Cheung, 1982).

Das beobachtete Verhalten des Kanals wird erklärt, wenn eine solche Sequenz zwei Konformationen annehmen kann. In der 'Stöpselform' ist die Kette gestreckt und geladen und paßt in den Kanal, und in der 'Chelatform' ist

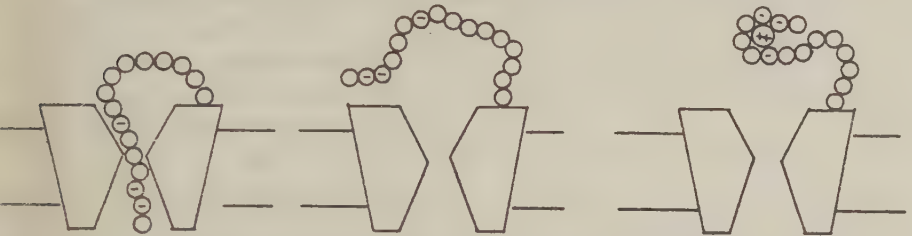
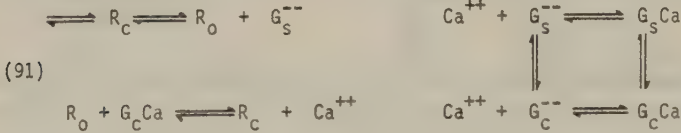


Fig. 35. Schematische Darstellung des Gatters mit zwei Konformationen, einer gestreckten Stöpselform und einer Chelatform.

sie aufgerollt und bildet eine Calcium - affine Tasche. (Fig. 35). Im verschlossenen Kanal ist, schon aus sterischen Gründen, nur die Stöpselform möglich. Nach dem Öffnen des Kanals befindet sich das Gatter aber in der wäßrigen Phase und beide Konformationen stehen in einem Gleichgewicht. Die für den Kanal inaktive Chelatform wird dabei durch das Komplexieren von Calcium stabilisiert. Es ist auch denkbar, daß Calciumionen die Umwandlung direkt induzieren (vielleicht rollt sich die Peptidsequenz um ein angelagertes Calciumion herum auf). Die Rückumwandlung zur Stöpselform ist nur möglich, wenn das Calciumion wieder abdissoziiert ist, also gerade kein Calciumion gebunden ist. In Gegenwart von hohen Ca^{++} -Konzentrationen befindet sich das Gatter fast ständig in der Chelatform und ist dem Kanal somit entzogen. Soweit entspricht diese Beschreibung genau dem Reaktionsschema.

Die Sättigung der Öffnungs - Lebensdauern wird nun durch einen weiteren Schritt begründet, indem der Kanalöffnung selbst eine gewisse Affinität für die Stöpselform des Gatters zugeschrieben wird. Das Gatter blockiert den Kanal also nicht nur aufgrund elektrostatischer Kräfte, sondern wird in seiner Stöpselform selbst spezifisch von der Pore gebunden. Dann kann die Wechselwirkung mit dem Kanal die Umwandlung von der Chelatform zur Stöpselform selbst dann induzieren, wenn jene durch ein gebundenes Calciumion stabilisiert ist. Das gebundene Calciumion wird dann abgestoßen und der Kanal kann auch in Gegenwart hoher Ca^{++} -Konzentrationen verschlossen werden. Die Lage des oberen Knicks in Fig. 31 und 32 macht dann eine Angabe zur Affinität des Kanals für sein eigenes Gatter. Das Postulat einer spezifischen Bindung des Gatters an den Kanal erlaubt außerdem, die Aktivierung

des Kanals als einen von der Blockadereaktion unabhängigen Vorgang zu betrachten, während noch in Methfessel und Boheim (1982) von einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem Gatter und der niedrigaffinen Bindungsstelle die Rede war. Die entsprechende Erweiterung des Reaktionsschemas ist:



Es ist dabei deutlich zu sehen, daß der Kanal nach dieser Vorstellung kein einfaches lineares Reaktionsschema mehr aufweist. Auch die Annahme, daß die Reaktionen des Gatters schnell verlaufen, ist nicht mehr unbedingt vertretbar, da es sich jetzt um eine zusätzliche Konformationsänderung einer Peptidkette handelt.

Die Vorstellung eines derartigen Gatters, welches den Kanal verschließt, findet in zwei experimentellen Befunden zusätzliche Unterstützung. Wie im nächsten Abschnitt ausführlicher besprochen wird, ist der sogenannte SR-Kanal aus Muskelzellen mit dem Ca^{++} -abhängigen K^+ -Kanal in vieler Hinsicht verwandt. Für diesen Kanal fanden Miller und Rosenberg (1979), daß er nach Behandlung mit einem proteolytischen Enzym seine Spannungsabhängigkeit weitgehend verliert. Es ist allerdings ohne jede genauere Kenntnis der Struktur des Kanals etwas gewagt, von einem Ablösen des Gatters zu sprechen. Zweitens würde man bei Hemmung von Calmodulin in der Zelle eine erhöhte Calciumkonzentration und damit eine Erhöhung des Calcium-abhängigen Kalium-Ausstroms erwarten. Dagegen berichten aber Lackington und Orrega (1981) von einer Hemmung dieses Stroms durch Calmodulinblockierende Pharmaka. Auch dieses (nach Schwarz und Passow 1983 allerdings kontroverse) Ergebnis könnte in diesem Zusammenhang zu Spekulationen verleiten.

Eine weitere noch offene Frage betrifft die Wirkungsweise von Kobalt und ähnlichen Ionen auf diesen Kanal. Es ist denkbar, daß solche Ionen direkt in die Kinetik eingreifen, zum Beispiel durch Konkurrenz mit Calcium. In den auf Seite 78 beschriebenen Versuchen hätte das Kobalt dazu durch die Membran an die Innenseite gelangen müssen. Versuche mit Kobalt an der Innenseite der Membran sind bisher an Einzelkanälen noch nicht durchgeführt worden. Wahrscheinlicher ist allerdings, daß die Schwermetall-Ionen den Kanal indirekt beeinflussen, indem sie einen unabhängigen Calcium-

Einstrom blockieren und dadurch zu einer Reduktion von $[Ca^{++}]_i$ in unmittelbarer Nähe der Membran führen. Es ist bekannt, daß solche Ca^{++} -Einströme durch Co^{++} und andere Ionen blockiert werden (Heyer und Lux 1976). Für eine solche indirekte Wirkung spricht weiter, daß der Kobalt - Effekt bei negativen Spannungen stärker als bei positiven Spannungen war. Auch mit EGTA-gepufferten Innenlösungen war der Kobalt - Effekt geringer, dabei ist aber zu bedenken, daß EGTA auch Kobalt mit hoher Affinität binden und so vom Kanal fernhalten kann.

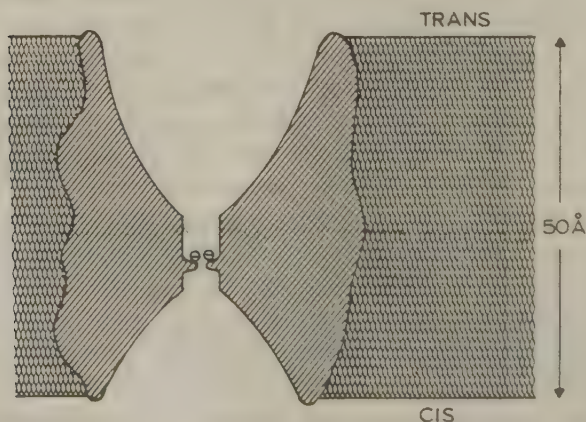
5.2. Leitwert und Ionenselektivität

Obwohl in dieser Arbeit die Kinetik des Calcium - abhängigen Kalium - Kanals im Vordergrund steht, ist es interessant, den Blick kurz auf den eigentlichen Ionentransport durch diesen Kanal zu richten. Die unmodifizierte Lipidmembran stellt, wie eingangs beschrieben, eine gut isolierende Barriere für geladene Ionen dar. Ionenkanäle haben deshalb die Funktion, eine hydrophile Pore zu schaffen, also einen Bereich erhöhter Dielektrizitätszahl, durch welchen Ionen die Membran überqueren können. Im einfachsten Fall könnte dies durch ein einfaches wassergefülltes Loch geschehen. Die meisten Kanäle sind jedoch sehr wählerisch in bezug auf die Arten der Ionen, welche sie passieren lassen.

Latorre und Miller (1983) teilen die bisher bekannten Ionenkanäle gemäß ihrer Ionenselektivität in Klassen ein. Unspezifische Kanäle lassen alle Ionen durch, die eine gewisse Größe nicht überschreiten. Sie lassen sich ganz einfach als eine wassergefüllte Pore verstehen. Valenzspezifische Kanäle können zwischen Kationen und Anionen, aber nicht zwischen Ionen derselben Wertigkeit unterscheiden. Naheliegend ist, daß geladene Gruppen am Eingang des Kanals diese Selektion bewirken. Ionenspezifische Kanäle sind dagegen nur für eine ganz spezielle Ionensorte durchlässig. Andere Ionen, auch derselben Wertigkeit, können nur wenig oder gar nicht hindurchtreten. Dies läßt sich nur durch ein spezifisches Selektivitätsfilter im Kanal erklären. Als Modell für ein solches Selektivitätsfilter wird häufig eine Folge von Bindungsstellen betrachtet, welche eine spezifische Affinität für die 'richtigen' Ionen besitzen und diese in mehreren Bindungsschritten durch die Membran bringen (Läuger 1981). Eine besonders ausgeprägte Selektivität bedeutet dann eine starke, spezifische Bindung des Ions, die mit einer hohen Wechselzahl oder Durchtrittsrate nicht ohne weiteres vereinbar ist. Die Leitwerte von ionenselektiven Kanälen liegen dementsprechend zwischen 2 und 20 pS (Latorre und Miller 1983, Table).

Die in diesem Zusammenhang bemerkenswerte Eigenschaft des Calcium - abhängigen Kalium - Kanals ist, einen hohen Leitwert über 200 pS mit einer sehr hohen Selektivität für Kalium zu verbinden. Deshalb stellen Latorre und Miller (1983) diesen Kanal, zusammen mit vergleichbaren Kanälen aus anderen Zellen, als 'maxi-K⁺-channel' in eine eigene Klasse und gehen am Beispiel des ähnlichen (aber etwas weniger selektiven und nicht Ca⁺⁺-abhängigen) K⁺- Kanals aus dem sarkoplasmischen Retikulum von Kaninchenmuskeln (SR-Kanal) auf diese Frage ein. Sie kommen zu dem Ergebnis, daß der SR- Kanal nur ein sehr kurzes Selektivitätsfilter besitzt, in welchem nur ein Ion auf einmal Platz hat. Damit vereinbar ist auch, daß der Leitwert dieser Kanäle bei zunehmender Kaliumkonzentration gemäß der Michaelis - Menten - Kinetik eine Sättigung zeigt (Latorre und Miller 1983). Latorre und Miller sehen ein zweites Problem darin, daß Kaliumionen durch die wäßrige Lösung gar nicht so schnell an den Kanal herandiffundieren können, wie es dem hohen Kanalleitwert entspricht. Deshalb schlagen sie vor, daß der Kanal vor dem Selektivitätsfilter einen etwas weiteren Tunnel besitzt, entlang welchem ein Teil der Spannung abfällt und die Ionen an das Selektivitätsfilter heranzieht. Miller (1982) hat in Versuchen mit verschiedenen Blockern des Kanals sowie mit Messung von Strömungspotentialen versucht, die Struktur des SR- Kanals auszumessen, und zeichnete das in Fig. 36 gezeigte Bild, welches in etwa auch für den Ca⁺⁺- abhängigen K⁺- Kanal zutreffen könnte.

Fig. 36. Schematische Darstellung des SR- Kanals (aus Miller 1982)

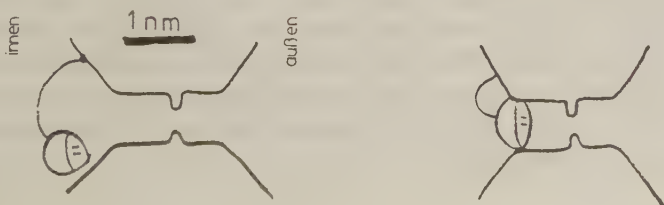


Es ist sicher unvorsichtig, solche Zeichnungen als geometrisches Bild des Kanals aufzufassen. Dazu sind Annahmen nötig, zum Beispiel ein konstantes elektrisches Feld im Inneren des Kanals, rigide Tunnelwände und als harte Kugeln darstellbare Ionen, die sicher nicht zutreffen. Die Vorstellung eines solchen Tunnels paßt jedoch sehr gut zu dem Aktivierungs - Blockade - Modell mit einem Calcium - sensitiven Gatter, welches zur Beschreibung des Calcium - abhängigen Kaliumkanals aufgestellt wurde. Ein naheliegender Einwand gegen dieses Modell ist nämlich, daß eine (noch dazu negativ geladene) Peptidkette wohl kaum durch ein Selektivitätsfilter paßt, welches sogar Na^+ und K^+ - Ionen sauber trennen kann. Dagegen ist es sehr gut vorstellbar, daß das Gatter in einer geeigneten Konformation einen 0,7 nm breiten Tunnel verstopfen kann. Die Tatsache, daß die Ladung des Gatters scheinbar durch das volle Membranpotential bewegt wird, ist damit durchaus vereinbar. Maßgeblich für die spannungsabhängige Kinetik der Blockade ist nicht der elektrische Feldverlauf im offenen Kanal, sondern das Potential auf welchem sich die Ladungen des Gatters im offenen und blockierten Zustand befinden. Beim offenen Kanal ist dies das Potential auf der Innenseite der Membran. Im blockierten Zustand ist es dagegen auch dann das Potential der Außenseite, wenn das Gatter nicht das Selektivitätsfilter passiert hat. Es genügt, wenn im blockierten Zustand die Membranspannung über dem Gatter abfällt, weil das Selektivitätsfilter einen vernachlässigbar kleinen Serienwiderstand darstellt (Fig. 37).

Fig. 37. Illustration zur Blockade des Tunnels vor dem Selektivitätsfilter durch ein geladenes Gatter.

Links: offener Kanal. Das Gatter befindet sich außerhalb und seine Ladungen sehen das Potential der Salzlösung auf der Innenseite der Membran. Das Membranpotential fällt im Tunnel und am Selektivitätsfilter ab.

Rechts: blockierter Kanal. Das Gatter verstopft den Tunnel. Das gesamte Potential fällt über das Gatter ab, weil der Widerstand des Selektivitätsfilters vergleichsweise klein ist. Durch das sehr starke Feld verformt sich das Gatter und wird in den Tunnel eingerastet.



Die Vorstellung eines Tunnels vor dem Selektivitätsfilter kann auch erklären, warum, wie auf S. 77 gezeigt, die TEA- Blockade nach Entfernung des TEA nur langsam zurückgeht. Dies wäre zu erwarten, wenn die TEA- Ionen den Tunnelbereich nur allmählich wieder verlassen können, weil sie dazu gegen die dort abfallende Spannung diffundieren müssen.

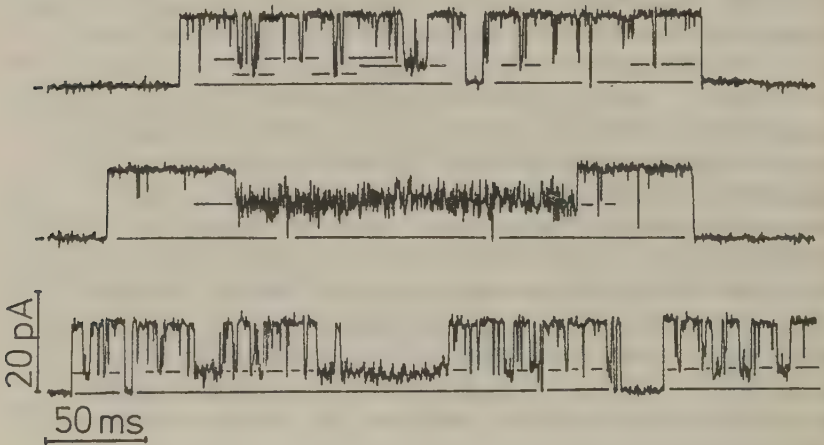


Fig. 38. Ausgewählte Beispiele für Sublevels am Calcium - abhängigen Kalium - Kanal bei + 60 mV, beidseitig 150 mM KCl.

Eine weitere Beobachtung an diesem Kanal ist das Auftreten von teilweise geschlossenen Kanalzuständen oder 'Sublevels' (Methfessel und Boheim 1982, Barrett et al. 1982). Obwohl solche Ereignisse recht selten vorkommen, sind in Fig. 38 einige ausgewählte Beispiele gezeigt. Auch am Acetylcholin - Rezeptorkanal sind Sublevels beobachtet worden (Hamill und Sakmann 1981). Dort treten aber streng definierte Leitwerte auf, und von den Sublevels aus kann der geöffnete oder der geschlossene Kanalzustand angenommen werden. Wie Fig. 38 illustriert, treten beim Calcium - abhängigen Kaliumkanal dagegen viele verschiedene Leitwerte mit unterschiedlicher Häufigkeit als Sublevels auf, und der Kanal nimmt stets wieder den offenen Zustand an, bevor er ganz schließt. Dies spricht dafür, daß Sublevels bei diesem Kanal durch ein 'falsches' oder nur teilweises Einsetzen des Gatters entstehen könnten, oder auch durch ein teilweises Blockieren des Tunnels durch irgendwelche Fremdsubstanzen.

Völlig unklar ist noch, warum die Leitwerte des Kanals von einem Experiment zum nächsten unterschiedlich ausfallen (Fig. 21). Beim Outside - Out - Patch ist denkbar, daß ein unvollständig geöffneter innerer Vesikel zu reduzierten Leitwerten führt. Dabei wären aber charakteristische Verzerrungen des Signals zu erwarten (Hamill et al. 1981), die in keinem Fall beobachtet wurden. Es ist also offenbar eine echte Eigenschaft dieser Kanäle, deren Deutung noch aussteht.

5.3. Zur biologischen Funktion des Kanals

Ein Calcium - abhängiger Kalium - Ausstrom ist an sehr vielen Zellen beobachtet worden (Meech 1978, Schwarz und Passow 1983). In den letzten Jahren sind einzelne Calcium - abhängige Kalium - Kanäle an einer ganzen Reihe von Präparaten mit der Patch - Clamp - Methode gefunden worden (Marty 1981, Lux et al. 1981, Hamill 1981, Pallotta et al. 1981, 1982, Adams et al. 1982, Barrett et al. 1982, Methfessel und Boheim 1982, Walsh und Singer 1983, Maruyama et al. 1983). Zusätzlich gelang für den Calcium - abhängigen Kalium - Kanal aus Kaninchen - Transversal - Tubuli die Rekonstitution in planare Lipid - Bilayer (Latorre et al. 1982). In fast allen Fällen sehen die Einzelkanäle dabei sehr ähnlich aus. Sie zeigen die typische, von Bursts und Flickers geprägte Kinetik und verbinden eine hohe Selektivität für Kalium mit einem hohen Leitwert. Im Detail gibt es auch Unterschiede, z. B. in den Leitwerten. Eine besondere Spielart scheint der Kanal in Erythrocyten darzustellen, wo seine Leitfähigkeit nur 18 pS beträgt (Hamill 1981). Gerade an Erythrocyten ist der Calcium - abhängige Kalium - Ausstrom mit klassischen Methoden besonders ausführlich untersucht worden (Schwarz und Passow 1983).

Es ist interessant, inwieweit diese Kanäle eine gemeinsame molekulare Grundlage haben. Zum genauen Vergleich der Kanäle von unterschiedlichen Präparaten bedarf es aber quantitativer Aussagen, die bisher nur sehr spärlich vorliegen. Barrett et al. (1982) haben, ebenfalls an kultivierten Rattenmuskeln, die Öffnungswahrscheinlichkeit p_o bestimmt. Ihr Auswertverfahren trennte jedoch nicht die Bursts von den übrigen geschlossenen Ereignissen. Deshalb stimmen ihre Ergebnisse nur bei Spannungen und Calciumkonzentrationen, wo die Bursts keine Rolle spielen, gut mit den hier dargestellten Resultaten überein. Latorre et al. (1982) haben ebenfalls p_o bestimmt, aber auf die Bursts geachtet. Ihren Daten zufolge verhält sich der Kanal aus T- Tubuli im Prinzip ganz ähnlich wie der aus Myotubes, er

besitzt aber eine wesentlich geringere Affinität für Calcium. Weitere Vergleiche müssen warten, bis auch an anderen Präparaten entsprechende kinetische Untersuchungen, insbesondere der Zustands - Lebensdauern, durchgeführt sind.

Obwohl Calcium - abhängige Kalium - Kanäle offenbar sehr weit verbreitet sind, ist über ihre biologische Funktion, sehr wenig bekannt. Über mögliche Rollen an Nervenzellen ist viel spekuliert worden (Meech 1978). Allerdings treten solche Kanäle auch an nichterregbaren Zellen auf, so daß ihre Hauptfunktion wahrscheinlich nicht mit den speziellen Eigenschaften von Neuronen zu tun hat. An Skelettmuskelfasern wird ein Calcium - abhängiger Kalium - Ausstrom gefunden (Fink et al. 1983), der möglicherweise mit dem Calcium - abhängigen Kalium - Kanal in Verbindung gebracht werden könnte. Er tritt jedoch nur unter derart extremen Bedingungen auf, daß sich eine physiologische Rolle am gesunden Muskel schwer vorstellen läßt.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß der Calcium - abhängige Kaliumkanal - im Gegensatz zum Beispiel zum Acetylcholin - Rezeptorkanal - immer am abgetrennten (Inside oder Outside- Out) Patch studiert wird. Mir ist es nur sehr selten gelungen, diesen (oder zumindest einen ähnlich aussehenden) Kanal im Cell - attached Patch zu erhalten. Häufiger sind Fluktuationen, die denen des Calcium - abhängigen Kalium - Kanals gleichen, für eine kurze Zeit nach Bildung des Gigaseal sichtbar. Sie hören aber nach einigen Sekunden auf und erscheinen nicht wieder, bis der Patch abgetrennt wurde. Es ist denkbar, daß im Moment der Bildung des Gigaseals die Membran lokal beschädigt wird und die Kanäle damit, zum Beispiel durch einströmendes Calcium, aktiviert werden.

Es ist deshalb möglich, daß der Calcium - abhängige Kalium - Kanal unter normalen physiologischen Bedingungen überhaupt nicht aktiv wird, oder sogar durch intrazelluläre Stoffwechselkomponenten inaktiviert wird. Er hätte dann die Funktion eines 'Emergency' - Kanals. Das Zellinnere ist bei gesunden Zellen im Normalfall durch ein negatives Potential und eine niedrige Calciumkonzentration gekennzeichnet. Abweichungen von diesen Bedingungen, zum Beispiel bei der Kontraktion einer Muskelzelle, sind transient. Bei extremer metabolischer Erschöpfung oder bei chemischer oder mechanischer Beschädigung der Zellmembran dringt dagegen unkontrolliert Calcium in die Zelle ein, und das Membranpotential droht zusammenzubrechen. Eine für das Überleben der Zelle wichtige Funktion wäre es, in einer solchen

Situation durch eine dramatische Erhöhung der Kaliumleitfähigkeit zuerst die Erhaltung des Membranpotentials sicherzustellen. Die gute Selektivität, die hohen Leitwerte und die Calcium- und spannungsabhängige Kinetik dieser Kanäle lassen sie für diese Aufgabe vorzüglich geeignet erscheinen. Dies würde auch das Vorhandensein solcher Kanäle in den Membranen nichterregbarer Zellen, wie zum Beispiel Erythrocyten, überzeugend erklären, da auch nicht erregbare Zellen ihr Membranpotential unter allen Bedingungen erhalten müssen.

-

Zusammenfassung

Seit Hodgkin und Huxley (1952) die Ionentheorie der Erregung aufstellten, hat sich die Vorstellung durchgesetzt, daß die elektrische Leitfähigkeit von biologischen Membranen durch spezielle Ionenkanäle bestimmt wird. Die von Neher und Sakmann (1976) entwickelte Patch - Clamp - Methode erlaubt, den durch einzelne Kanäle fließenden Ionenstrom direkt zu messen und stellt damit die Elektrophysiologie auf eine neue experimentelle Grundlage. Aus der Sicht der physikalischen Chemie ist ein Ionenkanal ein Makromolekül, welches eine Reihe von Konformationen annehmen kann. Das Besondere ist, daß manche Zustände des Moleküls durch einen meßbaren Ionenstrom signalisiert werden. Dadurch wird es möglich, chemische Fragen an einem individuellen Molekül zu untersuchen.

Nach Colquhoun und Hawkes läßt sich ein Ionenkanal im Gleichgewicht als ein Markov - Prozeß in kontinuierlicher Zeit beschreiben. Dazu werden die Geschwindigkeitskonstanten des chemischen Systems in einer Matrix zusammengefaßt, aus welcher sich das statistische Verhalten des Kanals berechnen läßt. Es werden zum Beispiel die Verweildauern in einzelnen Zuständen oder Gruppen von Zuständen, mittlere Öffnungswahrscheinlichkeiten, u.s.f. bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die umgekehrte Frage gestellt, ob aus dem statistischen Verhalten der beobachteten Stromfluktuationen Aussagen über die chemischen Eigenschaften des Kanal-moleküls gewonnen werden können. Dazu erweist sich die prinzipiell richtige Beschreibung des Ionenkanals als ein kontinuierlicher Markov - Prozeß als für die Praxis ungeeignet. Die experimentellen Daten haben immer eine begrenzte Zeitauflösung, die eine Beschreibung durch eine Markov - Kette in diskreter Zeit nahelegt. Dies kommt auch einer Computer - Auswertung der Daten sehr entgegen.

Die gemessenen Stromfluktuationen werden digitalisiert und mit dem Computer durch eine diskrete Markov - Kette beschrieben. Aus den Parametern der diskreten Kette kann mit einfachen algebraischen Operationen die Matrix der Geschwindigkeitskonstanten für den zugrundeliegenden kontinuierlichen Prozeß, und damit die chemische Beschreibung des Moleküls, bestimmt werden. Voraussetzung für dieses Verfahren ist, daß alle Zustände des Kanals eindeutig identifiziert werden können. Ist dies nicht der Fall, so muß sich die Auswertung auf einzelne Reaktionsschritte beschränken oder von vornherein Annahmen über das System machen.

Als praktisches Beispiel eines Ionenkanals wurde der Calcium - abhängige Kalium - Kanal von Rattenmuskelzellen gewählt. Dieser Kanal zeigt eine ganze Reihe von Zuständen. In dieser Arbeit wurde das Öffnen des Kanals in seinen aktiven Phasen untersucht. Dieser Reaktionsschritt zeigt eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Spannung und von der Calciumkonzentration auf der Innenseite der Membran.

Zur Durchführung von Patch - Clamp - Versuchen wurde ein Meßplatz aufgebaut. Als biologisches Präparat wurden embryonale Rattenmuskelzellen (Myotubes) kultiviert. Es wurde mit isolierten Membran - Patches in der Outside - Out Konfiguration gearbeitet. Zur Bestimmung der Calciumabhängigkeit wurden auf der Innenseite der Membran EGTA- Calcium - Pufferlösungen verwendet. Für die Auswertung der Einzelkanalfluktuationen wurden Computer - Programme geschrieben, die eine bequeme Analyse von längeren Meßspuren ermöglichen.

Die Stromfluktuationen wurden mit dem Computer statistisch analysiert. Dabei wurden die mittlere Öffnungswahrscheinlichkeit und die Lebensdauern des offenen und geschlossenen Kanalzustands bestimmt. Aus der Spannungsabhängigkeit dieser Größen läßt sich schließen, daß die Öffnung des Kanals mit einem Transfer von zwei Ladungen durch das Membranpotential verbunden ist. Aus der Calciumabhängigkeit folgt, daß der Kanal nicht durch eine einfache Aktivierungsreaktion beschreibbar ist, weil auch die Lebensdauer des offenen Zustands von der Calciumkonzentration beeinflusst wird. Zwischen Spannung und Calcium besteht eine Äquivalenz in ihren Wirkungen auf den Kanal.

Zum Verständnis des Kanals wurde ein Aktivierungs - Blockade - Modell entwickelt, welches die beobachteten statistischen Eigenschaften richtig vorhersagt. Dieses Modell beinhaltet, daß der Kanal durch ein externes Gatter blockiert wird, welches dem Kanal durch Calcium entzogen werden kann. Das Gatter trägt eine Ladung, die die Spannungsabhängigkeit der Reaktion bewirkt.

Damit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß aus einer statistischen Analyse von Einzelkanalfluktuationen detaillierte Aussagen über die Kinetik und Struktur von Ionenkanälen gewonnen werden können.

Literatur

- Adams, P.R. (1981) Acetylcholine receptor kinetics.
J.Membrane Biol. 58, 161-174
- Adams, P.R., Constanti, A., Brown, D.A. and Clark, R.B. (1982)
Intracellular Ca^{2+} activates a fast voltage-sensitive K^+ current
in vertebrate sympathetic neurones. Nature 296, 746-748
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Ruff, M., Roberts, K. and Watson, J.D.
(1983) The Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc. New York
- Alberty, R.A. and Daniels, F. (1979) Physical Chemistry 5.ed.
John Wiley, New York
- Barrett, J.N., Magleby, K.L. and Pallotta, B.S. (1982) Properties of
single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle.
J.Physiol. (London) 331, 211-230
- Bittel, H. und Storm, L. (1971) Rauschen Springer-Verlag Berlin 1971
- Bergmann, C. and Meves, H. (1981) The Excitable Membrane of Nerve Fibres.
In: Membranes and Intercellular Communication, R. Balian et al, eds.
North-Holland, Amsterdam
- Blinks, J.R., Gil Wier, W., Hess, P. and Prendergast, F.G. (1982) Measurement
of Ca^{++} concentrations in living cells. Prog. Biophys. molec. Biol. 40, 1-114
- Blondel, B., Roijen, I., Cheneval, J.P. (1971) Heart Cells in Culture:
a simple method for increasing the proportion of myoblasts.
Experientia 27, 356-358
- Boheim, G., Hanke, W., Barrantes, F.J., Eibl, H., Sakmann, B., Fels, G.
and Maelicke, A. (1981) Agonist - activated ionic channels in acetylcholine
receptor reconstituted into planar lipid bilayers.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3586-3590
- Boheim, G., Hanke, W., Methfessel, C., Eibl, H., Kaupp, U.B., Maelicke,
A. and Schultz, J.E. (1982) Membrane reconstitution below lipid phase
transition temperature. In: Transport in Biomembranes, Model Systems and
Reconstitution R.Antolini et al., eds. Raven Press, New York
- Boheim, G., Hanke, W. and Jung, G. (1983) Alamethicin Pore Formation:
Voltage-Dependent Flip-Flop of α - Helix Dipoles.
Biophys. Struct. Mech. 9, 181-191

- Bernstein, J. (1902) Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme. Pflügers Arch. 92, 521-562
- Cheung, W.Y. (1982) Calmodulin. Scientific American 246, 48-56
- Chung, K.L. (1967) Markov Chains with stationary transition probabilities. Springer-Verlag, New York
- Chung, K.L. (1979) Elementary Probability Theory with Stochastic Processes. Springer-Verlag, New York
- Colquhoun, D. and Hawkes, A.G. (1977) Relaxation and fluctuations of membrane currents that flow through drug operated channels. Proc. R. Soc. London B199, 231-262
- Colquhoun, D. and Hawkes, A.G. (1981) On the stochastic properties of single ion channels. Proc. R. Soc. London B 211, 205-235
- Colquhoun, D. and Hawkes, A.G. (1982) On the stochastic properties of bursts of single ion channel openings and of clusters of bursts. Phil. Trans. R. Soc. London B 300, 1-59
- Corey, D.P. and Stevens, C.F. (1983) Science and technology of patch recording electrodes. In: Single - Channel Recording in biological membranes, E. Neher and B. Sakmann, eds., in press
- Danielli, H. and Davson, H. (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. J. Cell. Physiology 5, 495-508 (1935)
- Ferschl, F. (1970) Markovketten. Lecture Notes in Operations Research and Mathematical Systems vol. 35, Springer-Verlag, Berlin
- Fink, R., Hase, S., Lüttgau, H.C. and Wettwer, E. (1983) The effect of cellular energy reserves and internal Ca^{++} on the potassium conductance in skeletal muscle of the frog. J. Physiol. (1983) 336, 211-228
- Fritz, F.J., Huppert, B. und Willems, W. (1979) Stochastische Matrizen. Springer-Verlag, Berlin
- Gorter, E. and Grendel, F. (1925) On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of blood. J. Exp. Med. 41, 439-443
- Hamill, O.P. (1981) Potassium channel currents in human red blood cells. J. Physiol. 319, P 97-98
- Hamill, O.P. and Sakmann, B. (1981) Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells. Nature 294, 462-464

- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391, 85-100
- Hanke, W., Methfessel, C., Wilmsen, U. and Boheim, G. (1983) Ion channel reconstitution into lipid bilayer membranes on glass patch pipettes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, in press
- Heyer, C.B. and Lux, H.D. (1976) Properties of a facilitating calcium current in pace-maker neurones of the snail *Helix Pomatia*. *J. Physiol.* 262, 319-348
- Hodkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (London)* 117, 500-544
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. and Katz, B. (1952) Measurement of current - voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (London)* 108, 37-77
- Karlin, S. and Taylor, H.M. (1975) A first course in stochastic processes. Academic Press, New York
- Katz, B. (1966) Nerve, Muscle, and Synapse. Mc Graw - Hill Inc. New York
- Katz, B. and Miledi, R. (1972) The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components. *J. Physiol. (London)* 224, 665-699
- Kemeny, J.G. and Snell, J.L. (1976) Finite Markov Chains Springer-Verlag, New York
- Lackington, I. and Orrega, F. (1981) Inhibition of Calcium-activated potassium conductance of human erythrocytes by calmodulin inhibitory drugs. *FEBS Lett.* 133, 103-106
- Läuger, P. (1981) Ion transport through lipid bilayer membranes. In: Membranes and Intercellular Communication R. Balian et al., eds. North Holland, Amsterdam.
- Latorre, R.C., Vergara, C. and Hidalgo, C. (1982) Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca^{2+} -dependent K^{+} -channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 264, 304-317
- Lux, H.D., Neher, E. and Marty, A. (1981) Single channel activity associated with the calcium-dependent outward current in *Helix Pomatia*. *Pflügers Arch.* 389, 293-295

- Marty, A. (1981) Ca - dependent K - channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature* 291, 497-500
- Maruyama, Y., Petersen, O.H., Flanagan, P. and Pearson, G.I. (1983) Quantification of Ca^{2+} -activated K^+ Channels under hormonal control in pig pancreas acinar cells. *Nature* 305, 228-232
- Meech, R.W. (1978) Calcium - dependent potassium activation in nervous tissues. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 7, 1-18
- Meech, R.W. and Standen, N.B. (1975) Potassium activation in *Helix Aspersa* neurones under voltage clamp: a component mediated by calcium influx. *J. Physiol.* 249, 211-239
- Methfessel, C. and Boheim, G. (1982) The gating of single calcium - dependent potassium channels is described by an activation/blockade mechanism. *Biophys. Struct. Mech.* 9, 35-60
- Miller, C. (1978) Voltage - Gated Cation Conductance channel from Fragmented Sarcoplasmic Reticulum: Steady - State electrical properties. *J. Membrane Biol.* 40, 1-23
- Miller, C. (1982) Feeling around inside a channel in the dark. In: Transport in Biomembranes, Model Systems and Reconstitution. R. Antolini et al., eds. Raven Press, New York
- Miller, C. and Rosenberg, R. (1979) Modification of a voltage-gated K^+ channel from sarcoplasmic reticulum by a pronase-derived specific endopeptidase. *J. Gen. Physiol.* 74, 457-478
- Montal, M. and Mueller, P. (1972) Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 3561-3566
- Mueller, P., Rudin, D.O., Tu Tien, H. and Wescott, W.C. (1962) Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System. *Nature* 194, 979-980
- Neher, E. (1974) Elektronische Meßtechnik in der Physiologie. Springer-Verlag, Berlin
- Neher, E. (1983) The charge carried by single-channel currents of rat cultured muscle cells in the presence of local anaesthetics. *J. Physiol.* 339, 663-678

- Neher, E. and Sakmann, B. (1976) Single - channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 779-802
- Neher, E. and Steinbach, J.H. (1978) Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine receptor channels. *J. Physiol.* 277, 153-176
- Nomarski, G. (1968) *J. Opt. Soc. Am.* 58, 1568
- Pallotta, B.S., Magleby, K.L. and Barrett, J.N. (1981) Single-channel recordings of Ca^{++} -activated K^{+} -currents in rat muscle cell culture. *Nature* 293, 471-474
- Pallotta, B.S., Magleby, K.L. and Barrett, J.N. (1982) Kinetics of the Ca^{++} -activated K^{+} -channel in cultured rat muscle. *Biophys. J.* 37, 318a
- Robertson, J.D. (1960) The molecular structure and contact relationships of cell membranes. *Prog. Biophys.* 10, 343-418
- Sakmann, B., Hamill, O.P. and Bormann, J. (1983) Patch - Clamp Measurements of elementary chloride currents activated by the putative Inhibitory Transmitters GABA and Glycine in Mammalian Spinal Neurons. *J. Neural Transmissions, Suppl.* 18, 83-95
- Sakmann, B., Patlak, J. and Neher, E. (1980) Single acetylcholine - activated channels show burst - kinetics in presence of desensitizing concentrations of agonist. *Nature* 286, 71-73
- Scharff, O. (1979) Comparison between measured and calculated concentrations of Calcium Ions in Buffers. *Anal. Chim. Acta* 109, 291-305
- Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y. (1963) Microdetermination of calcium by aequorin luminescence. *Science* 140, 1339-1340
- Schindler, H. and Quast, U. (1980) Functional acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata* in planar membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3052-3056
- Schwarz, W. und Passow, H. (1983) Ca^{2+} -Activated K^{+} -Channels in erythrocytes and excitable cells. *Ann. Rev. Physiol.* 45, 359-374
- Sillen, L.G. and Martell, A.E. (1964) Stability Constants of Metal - Ion Complexes. The Chemical Society, London, Special Publication 17
- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972) The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 175, 720-731

- Smith, B.T., Boyle, J.M., Dongarra, J.J., Garbow, B.S., Ikebe, Y., Klema, V.C. and Moler, C.B. (1976) Matrix Eigensystems Routines - EISPACK Guide. 2. ed. Lecture Notes in Computer Science Vol. 6 Springer-Verlag, Berlin
- Trube, G. and Isenberg, G. (1981) Determination of the Ca-EGTA apparent binding constant with a Calcium electrode. Pflügers Arch. 391 (Suppl.)R 58
- Tsien, R.Y. and Rink, T. (1980) Neutral carrier ion - sensitive microelectrodes for measurement of intracellular free calcium. Biochem. Biophys. Acta 599, 623-638
- Wong, B.S., Lecar, H. und Adler, M. (1982) Single calcium dependent potassium channels in dorsal anterior pituitary cells. Biophys. J. 39, 313-317
- Walsh, J.V. and Singer, J.J. (1983) Identification and characterization of a Ca^{++} -activated K^{+} -channel in freshly dissociated vertebrate smooth muscle cells using the patch-clamp technique. Biophys. J. 41 56a

Herrn Prof. Dr. G. Boheim danke ich herzlich für die sachkundige und verständnisvolle Betreuung dieser Arbeit, und natürlich für viele wichtige und hilfreiche Diskussionen.

Herrn Doz. Dr. B. Sakmann danke ich für die freundliche Einführung in die Patch-clamp-Technik und für die Gelegenheit, in seinem Labor zu experimentieren.

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind bereits erschienen in

C. Methfessel and G. Boheim
The Gating of Single Calcium-Dependent
Potassium Channels
Is Described by an Activation/Blockade Mechanism

Biophys. Struct. Mech. 9: 35-60 (1982)

Lebenslauf

Christoph Imanuel Methfessel

Geboren: am 10. Dezember 1951 in Clausthal-Zellerfeld

Eltern: Siegfried Methfessel, Physiker
Inge Methfessel, geb. Heide, Ärztin

Schule:

1958 - 1962 Klassen 1-4 der Primarschule in
Rüschlikon/Zürich (Schweiz)

1962 - 1965 Klassen 5-6 an der F.G.Lindsey Elementary
School, Montrose, New York (USA)

1965 - 1969 Besuch der Hendrick Hudson High School, Montrose
Abschluß mit dem High School Diploma

1969 - 1971 Klassen 12 und 13 am Graf Engelbert-Gymnasium,
Bochum. Abitur im Mai 1971

Wehrdienst: Vom 1. 7. 1971 bis zum 31.10.1972 in Goslar

Studium: Seit dem Wintersemester 1972 Physikstudium
an der Ruhr-Universität Bochum

1976 - 1979 Diplomarbeit bei Prof. Dr. M. Rosenberg
am Institut für Experimentalphysik VI
der Ruhr-Universität

Thema: " Metall-Halbleiter-Übergang und Supraleitung
von $\text{BaPb}_{1-x}\text{Bi}_x\text{O}_3$ "

Physik-Diplom im Februar 1980

Seit 1980 Doktorarbeit bei Prof. Dr. G. Boheim
am Lehrstuhl für Zellphysiologie der
Ruhr-Universität

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl
seit Oktober 1982

Seit dem 30. 9. 1983 verheiratet mit der Theologin
Annedore Methfessel, geb. Fortmann

Christoph Methfessel
Gerhart-Hauptmann-Str. 4
5810 Witten-Herbede

